

***ETUDE DES FACTEURS DE
REGENERATION, DES TECHNIQUES DE
MULTIPLICATION ET DE PRODUCTION
CAS DU KIWI (Actinidia chinensis PL.)***

Présentée par Chérifa CHAOUIA

Soutenu le 10 Décembre 2009

Directeur de thèse : M. SNOUSSI S.A. Professeur USDB, Blida
Devant le jury composé de : Mme DOUMANDJI-MITICHE B. Professeur ENSA Présidente
M. BELARBI B. M. Conférences ENSA
Examineur M. BENMOUSSA M. Professeur USDB, Blida Examineur

Table des matières

REMERCIEMENTS . .	7
LISTE DES ABREVIATIONS . .	8
Résumé . .	9
Abstract . .	10
ص غ ل م ل ا . .	11
INTRODUCTION . .	12
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE . .	14
CHAPITRE 1 : GENERALITES SUR L'ESPECE ACTINIDIA . .	14
1- Répartition de l'a <i>ctinidia chinensis</i> PL. . .	14
2- Botanique et physiologie . .	15
CHAPITRE 2 : TECHNIQUES DE PROPAGATION . .	18
1- Méthode traditionnelle . .	18
2- Micropropagation par bouturage . .	19
3- Bourgeonnement axillaire . .	19
4- Embryogenèse somatique . .	20
5- Culture de méristème . .	21
6- Culture de protoplastes . .	22
7- Sexage chez l'Actinidia . .	23
MATERIEL ET METHODES . .	25
1- Site de prélèvement et lieu de travail . .	25
2- Matériel végétal . .	25
2-1- Graines . .	25
2-2- Matériel végétal prélevé in- situ . .	28
3-Interprétation statistique . .	29
4- Prise des photographies . .	30
CHAPITRE 1 : ORGANOGENESE . .	31
1- Milieu destiné à induire la callogenèse . .	31
2- Milieu destiné à induire la caulogenèse . .	32
3- Milieu d'allongement des pousses feuillées . .	32
4- Milieu d'enracinement . .	33
5- Conditions de culture . .	34
6- Paramètres étudiés . .	34
7- Bourgeonnement axillaire . .	34
7-1- Plantules âgées de 8 semaines . .	35
7-2- Plantules âgées de 16 semaines . .	36
8-Paramètres étudiés . .	36
CHAPITRE 2 : EMBRYOGENESE SOMATIQUE . .	37
1. Techniques utilisées . .	37
2. Désinfection du matériel végétal . .	37
3- Embryogenèse somatique directe : ESD . .	38

3-1- Tigelles et cotylédons . . .	38
3-2- Feuilles . . .	39
4- Embryogenèse somatique indirecte (ESI) . . .	39
4-1- Plantules d'Actinidia : Station de Boufarik. . .	39
4-2- Plantules d'Actinidia : Station de Jourdain (Toulouse) . . .	40
5- Techniques histologiques . . .	41
CHAPITRE 3 : CULTURE DE MERISTEME . . .	42
1- Prélèvement des méristèmes . . .	42
2- Evolution du méristème . . .	43
2-1- Phase de bourgeonnement . . .	43
2-2- Phase de multiplication et d'allongement . . .	44
2-3- Phase d'enracinement. . .	44
3- Conditions de culture . . .	44
4- Acclimatation des plantules . . .	44
CHAPITRE 1 : ORGANOGENESE . . .	46
1- CALLOGENESE . . .	46
1-1- Matériel végétal issu de vitro-semis . . .	46
1-2- Matériel végétal prélevé in- situ . . .	49
2- CAULOGENESE . . .	53
2-1- Matériel végétal issu de vitro semis . . .	53
2-2- Matériel végétal prélevé in-situ . . .	55
3- ALLONGEMENT . . .	58
3-1- Matériel végétal issu de vitro- semis . . .	58
3-2- Matériel végétal prélevé in-situ . . .	59
4-RHIZOGENESE . . .	60
5- BOURGEONNEMENT AXILLAIRE . . .	62
5-1- Phase de multiplication des plantules de 8 semaines . . .	62
5-2- Phases de multiplication des plantules âgées de 16 semaines . . .	65
CHAPITRE 2 : EMBRYOGENESE SOMATIQUE . . .	69
1- Embryogenèse somatique directe . . .	69
1-1- Tigelles . . .	69
1-2- Cotylédons . . .	69
1-3- Feuilles . . .	70
2- Embryogenèse somatique indirecte . . .	70
2-1- Feuilles issues de plantules âgées de 8 semaines (station de Boufarik) . . .	71
2-2- Feuilles issues de plantules de 16 semaines (station de Boufarik) . . .	75
2-3- Feuilles issues de plantules âgées de 8 semaines (station de Jourdain, Toulouse) . . .	76
3- DISCUSSION ET PERSPECTIVES . . .	78
3-1- Embryogenèse somatique directe . . .	78
3-2- Embryogenèse somatique indirecte . . .	79
CHAPITRE 3 : LA CULTURE DU MERISTEME . . .	81

1- Evolution du méristème . .	81
1-1- Phase de bourgeonnement et comportement de l'Actinidia . .	81
1-2-Phase de multiplication et d'allongement . .	84
1-3- Phase d'enracinement des pousses feuillées . .	85
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES . .	88
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES . .	90
ANNEXES . .	99
<u>Annexe 1</u> : VARIETES FEMELLES D'ACTINIDIA . .	99
<u>Annexe 2</u> : VARIETES MÂLES D'ACTINIDIA . .	102
<u>Annexe 3</u> : METHODOLOGIES UTILISEES POUR L'OBTENTION DE L'EMBRYOGENESE SOMATIQUE DIRECTE CHEZ DIFFERENTES ESPECES . .	102
<u>Annexe 4</u> : METHODOLOGIES UTILISEES POUR L'OBTENTION DE L'EMBRYOGENESE SOMATIQUE INDIRECTE CHEZ DIFFERENTES ESPECES . .	105
<u>Annexe 5</u> : COMPOSITION DU MILIEU DE CULTURE UTILISES . .	108
<u>Annexe 6</u> : ESSAIS DE MULTIPLICATION PAR BOURGEONNEMENT AXILLAIRE AVEC EXPLANTS ISSUS DE PLANTULES DE 8 SEMAINES . .	111
<u>Annexe 7</u> : ESSAIS DE MULTIPLICATION PAR BOURGEONNEMENT AXILLAIRE AVEC EXPLANTS ISSUS DE PLANTULES DE 16 SEMAINES . .	111
<u>Annexe 8</u> : TRAITEMENTS D'INDUCTION D'EMBRYOGENESE SOMATIQUE DE PLANTULES AGEES DE 8 SEMAINES (BOUFARIK) . .	112
<u>Annexe 9</u> : TRAITEMENTS D'INDUCTION D'EMBRYOGENESE SOMATIQUE DE PLANTULES AGEES DE 16 SEMAINES (BOUFARIK) . .	113
<u>Annexe 10</u> : DEVELOPPEMENT ET DE MATURATION DES EMBRYONS SOMATIQUES DE PLANTULES AGEES DE 8 SEMAINES (BOUFARIK) . .	113
<u>Annexe 11</u> : DEVELOPPEMENT ET DE MATURATION DES EMBRYONS SOMATIQUES DE PLANTULES AGEES DE 16 SEMAINES (BOUFARIK) . .	114
<u>Annexe 12</u> : TRAITEMENTS D'INDUCTION DE CALLOGENESE ET D'EMBRYOGENESE SOMATIQUE DE PLANTULES AGEES DE 8 SEMAINES (TOULOUSE) . .	115
<u>Annexe 13</u> : DEVELOPPEMENT ET MATURATION DES EMBRYONS SOMATIQUES DE PLANTULES AGEES DE 8 SEMAINES (TOULOUSE) . .	115
<u>Annexe 14</u> : ANALYSE DE LA VARIANCE : TAUX DE LA CALLOGENESE (VITRO- SEMIS) . .	116
<u>Annexe 15</u> : VARIATION DU TAUX DE LA CALLOGENESE EN FONCTION DES DIFFERENTS MILIEUX ET TYPE D'EXPLANTS (VITRO- SEMIS) . .	116
<u>Annexe 16</u> : ANALYSE DE LA VARIANCE : POIDS FRAIS DES CALS (VITRO- SEMIS) . .	117
<u>Annexe 17</u> : VARIATION DU POIDS FRAIS DES CALS (mg), EN FONCTION DES DIFFERENTS MILIEUX ET TYPES D'EXPLANTS (VITRO- SEMIS) . .	117
<u>Annexe 18</u> : ANALYSE DE LA VARIANCE : POURCENTAGE DE CALLOGENESE (IN SITU) . .	118
<u>Annexe 19</u> : VARIATION DU TAUX DE LA CALLOGENESE EN FONCTION DES DIFFERENTS MILIEUX ET TYPES D'EXPLANTS (IN SITU) . .	118
<u>Annexe 20</u> : ANALYSE DE LA VARIANCE : POIDS FRAIS DES CALS (mg) (IN SITU) . .	118
<u>Annexe 21</u> : VARIATION DU POIDS FRAIS DES CALS (mg), EN FONCTION DES DIFFERENTS MILIEUX ET TYPES D'EXPLANTS (IN SITU) . .	119
<u>Annexe 22</u> : ANALYSE DE LA VARIANCE : TAUX DE POUSSES FEUILLEES DEVELOPPEES (VITRO- SEMIS) . .	119

<u>Annexe 23</u> : VARIATION DU TAUX DE POUSSES FEUILLEES EN FONCTION DES DIFFERENTS MILIEUX ET TYPES D'EXPLANTS (VITRO- SEMIS) . .	119
<u>Annexe 24</u> : ANALYSE DE LA VARIANCE : POIDS FRAIS DES CALS (VITRO- SEMIS) . .	120
<u>Annexe 25</u> : VARIATION DU POIDS FRAIS DES CALS (mg), EN FONCTION DES DIFFERENTS MILIEUX ET TYPES D'EXPLANTS (VITRO- SEMIS) . .	120
<u>Annexe 26</u> : ANALYSE DE LA VARIANCE : TAUX DE POUSSES FEUILLEES DEVELOPPEES (IN SITU) . .	121
<u>Annexe 27</u> : VARIATION DU TAUX DE POUSSES FEUILLEES EN FONCTION DES DIFFERENTS MILIEUX ET TYPES D'EXPLANTS (IN SITU) . .	121
<u>Annexe 28</u> : ANALYSE DE LA VARIANCE : POIDS FRAIS DES CALS (IN SITU) . .	121
<u>Annexe 29</u> : VARIATION DU POIDS FRAIS DES CALS (mg), EN FONCTION DES DIFFERENTS MILIEUX ET TYPES D'EXPLANTS (IN SITU) . .	122
<u>Annexe 30</u> : ANALYSE DE LA VARIANCE : LONGUEUR DE POUSSES FEUILLEES (VITRO- SEMIS) . .	122
<u>Annexe 31</u> : VARIATION DE LA LONGUEUR DE POUSSES FEUILLEES (cm), EN FONCTION DES DIFFERENTS MILIEUX ET TYPES D'EXPLANTS (VITRO- SEMIS) . .	122
<u>Annexe 32</u> : ANALYSE DE LA VARIANCE : LONGUEUR DE POUSSES FEUILLEES (IN SITU) . .	123
<u>Annexe 33</u> : VARIATION DE LA LONGUEUR DE POUSSES FEUILLEES (cm), EN FONCTION DES DIFFERENTS MILIEUX ET TYPES D'EXPLANTS . .	123
<u>Annexe 34</u> : NOMBRE MOYEN DE RAMEAUX PAR EXPLANT OBTENU PAR BOURGEONNEMENT AXILLAIRE . .	124
<u>Annexe 35</u> : LONGUEUR MOYENNE DES RAMEAUX (cm) PAR EXPLANT OBTENU PAR BOURGEONNEMENT AXILLAIRE . .	124
<u>Annexe 36</u> : TAUX DE VITRIFICATION DES RAMEAUX OBTENUS PAR BOURGEONNEMENT AXILLAIRE . .	124
<u>Annexe 37</u> : TAUX DE CALLOGENESE DES EXPLANTS A PARTIR DE CULTURE INITIALE D'EXTREMITE APICALE EN FONCTION DU MILIEU . .	125
<u>Annexe 38</u> : TAUX DE D'ENRACINEMENT DES EXPLANTS A PARTIR DE LA CULTURE INITIALE D'EXTREMITE APICALE EN FONCTION DU MILIEU . .	125
<u>Annexe 39</u> : TAUX DE CROISSANCE RELATIF (RGR) MOYEN DES CALS ISSUS DE JEUNES FEUILLES DE PLANTULES AGEES DE 8 SEMAINES SUR MILIEU D'INDUCTION . .	126
<u>Annexe 40</u> : TAUX DE CROISSANCE RELATIF (RGR) MOYEN DES CALS ISSUS DE JEUNES FEUILLES DE PLANTULES AGEES DE 16 SEMAINES SUR MILIEU D'INDUCTION . .	126
<u>Annexe 41</u> : TAUX DE CROISSANCE RELATIF (RGR) MOYEN DES CALS ISSUS DE JEUNES FEUILLES (TOULOUSE) . .	126
<u>Annexe 42</u> : TAUX DE REPRISE DE MERISTEMES DES QUATRE VARIETES ETUDIEES . .	126
<u>Annexe 43</u> : DIAMETRE DES ROSETTES DES JEUNES FEUILLES (mm) . .	127

REMERCIEMENTS

Toute ma gratitude va au Professeur Sid Ahmed SNOUSSI pour avoir accepté d'être mon Directeur de thèse (après les énormes problèmes que j'ai rencontré). Je lui suis également reconnaissante pour la disponibilité dont il a su faire preuve à mon égard, pour les conseils éclairés et pour les encouragements permanents qu'il m'a prodigué durant cette longue période.

Je témoigne ma reconnaissance au Professeur Bahia DOUMANDJI-MITICHE qui a accepté de présider et d'évaluer ce travail. Je la remercie pour son amabilité et sa disponibilité malgré le peu de temps dont elle dispose.

Mes vifs remerciements s'adressent au Professeur Baroudi BELARBI qui me fait l'honneur d'examiner ce travail. Je lui suis reconnaissante pour sa gentillesse malgré ses énormes tâches.

Je remercie très sincèrement le Professeur Mabrouk BENMOUSSA d'avoir accepté de juger ce travail malgré la lourde responsabilité du département d'Agronomie. En ce sens, je tiens à saluer ses compétences et l'aide qu'il m'a apporté avec autant d'enthousiasme et la bonne humeur.

Je remercie également, le Professeur Fairouz SAIDI pour ses conseils, ses encouragements, sa patience et son aide précieuse qu'elle m'a apporté pour l'aboutissement de cette thèse. De même, l'expérience du Professeur F/Z BENREBIHA m'a été très utile, je la remercie pour son aide au laboratoire, ses conseils et sa gentillesse.

Par ailleurs, il faut bien reconnaître que la rédaction de ce manuscrit n'aurait pu se dérouler dans de bonnes conditions sans l'efficacité, la compétence et la persévérance de monsieur Hamid GHEZALI en ce qui concerne l'outil informatique. Je lui exprime ici toute ma gratitude et ma reconnaissance.

Ce travail a également impliqué la participation d'autres équipes au sein d'autres laboratoires que je tiens ici à remercier pour leur collaboration : Professeur Paul CASSAGNES et Jean AGNES, du laboratoire de physiologie végétale de Purpan (Toulouse, France), Louiza BOUABDELLAH pour les coupes histologiques, du laboratoire de génétique de l'université Senia (Oran, Algérie), aux Professeurs Doru PAMFIL, MARGUITAS et toute l'équipe dynamique du laboratoire de biotechnologies végétales de Cluj-Napoca (Roumanie).

Un grand merci à madame Rachida SADOUKI, responsable du service PGRS de l'INA El-Harrach pour l'intérêt qu'elle porte aux thésards, ses encouragements et la confiance qu'elle nous donne.

Je remercie vivement Docteur Alia ABDULHUSSAIN pour l'aide qu'elle m'a apporté chaque fois que j'en ai eu besoin. Sa motivation et sa confiance ont été très appréciables.

Enfin, un grand merci à tous mes amis et collègues qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de cette thèse en occurrence Professeur Rachid KAIDI, mesdames Aouatif KAIDI, F/Z CHAOUCH et Fatima BOUCHENAK.

LISTE DES ABREVIATIONS

- ABA : acide abscissique
- AIA : acide indole-3-acétique
- AIB : acide-3-indole-butyrique
- BAP ou BPA : benzyladénine ou 6-benzylaminopirine
- CPPU : N-(2-chloro-4-pyridyl)-N'phenylurée
- ESD : embryogenèse somatique directe
- ESI : embryogenèse somatique indirecte
- FAA : formaldéhyde acide acétique
- GA₃ : gibbérelline
- GMS : milieu de Gambord et Murashige et Skoog (1962)
- AIA : acide indole-3-acétique
- ITAF : Institut Technique d'Arboriculture Fruitière
- Kin : kinétine
- MS : milieu de base Murashige et Skoog, (1962)
- MS/2 : milieu de base de Murashige et Skoog (1962) avec une dilution de 2x des macroéléments
- ANA : acide-1-naphtalo-acétique
- NaOCl : hypochlorite de sodium
- P : Probabilité
- PCR/RAPD : polymerase chain Reaction/Random Amplified polymorphic DNA
- PP : photopériode
- PPAS : plus petite amplitude significative
- RGR : relative growth rate (taux de croissance relatif)
- TDZ : thidiazuron
- 2.4-D : acide 2.4- dichlorophénoxyacétique

Résumé

L'*Actinidia* ou kiwi est une liane dioïque appartenant à la famille des Actinidiacées.

L'*Actinidia chinensis* PL. se reproduit difficilement par les techniques de multiplication traditionnelle (sexuée et asexuée).

L'objet de cette thèse, est d'étudier les possibilités de régénération et certaines techniques de micropropagation chez l'*Actinidia chinensis* PL.

Ainsi, nous avons pu démontrer que les explants prélevés à partir d'un végétal (vitro- semis) sont plus aptes à l'organogenèse et la callogenèse contrairement aux explants prélevés à partir du même végétal adulte.

Des extrémités apicales de plantules ont, montré un potentiel de multiplication par bourgeonnement axillaire assez élevé. Les rameaux axillaires repiqués sur un milieu de culture dépourvu en régulateur de croissance sont de meilleure qualité. D'autre part, des essais avec des cytokinines ou substance à action cytokinique ont révélé la capacité de la BAP à stimuler la ramification axillaire. Néanmoins, elle entraîne une perte de la qualité des rameaux produits. Ces derniers, montrent un pouvoir d'enracinement appréciable sur un milieu de culture dépourvu en régulateur de croissance.

Des essais réalisés en embryogenèse somatique directe et indirecte, ont montré la présence d'amas méristématiques de manière reproductible. Ils sont bien délimités au sein des cals induits sur des explants de disques foliaires. Le milieu de culture utilisé contient du 2.4-D (4,5 μ M) et de la kinétine (4,65 μ M). Le potentiel embryogène de ces amas permet d'adopter une nouvelle stratégie expérimentale visant à promouvoir son expression.

La reprise du dôme méristématique avec prolifération cellulaire a été intéressante sur le milieu Barlass. Les méristèmes de petite taille, repiqués sur milieu MS ont développé les meilleurs vitro-plants avec un enracinement important par l'utilisation de la technique de trempage dans l'AIB à 50 mg/l. Ce résultat, suggère que l'acclimatation de ces plantules est prometteuse et démontre la possibilité de régénération de l'espèce *Actinidia* (kiwi).

Mots clés : *Actinidia*- régénération- organogenèse- embryogenèse somatique- méristème.

Abstract

Actinidia or kiwi is a dioique liana belonging to the actinidiaceae family.

The *Actinidia chinensis* PL. Can't be reproduced easily by the traditional reproduct techniques (sexual and asexual).

The aim of the research is to study the regeneration possibilities and certain micropropagation techniques of *Actinidia chinensis* PL.

Therefore, we have shown that explants taken from the vegetal (vitro-seeding) are more suitable to the organogenesis than those taken from the adult vegetal.

Apical ends of plantlets have showed a quite high potential of multiplication by axillary budding. The axillary branches planted out on medium culture without growth regulator are of better quality.

On the other hand some trials done with cytokinins or substance with cytokinins action revealed the capacity of BAP to stimulate the axillary ramification.

However, it decreases the quality of the produced branches. These trials have showed that appreciable rooting ability on a medium culture without a growth regulator.

Some trials done on direct or indirect somatic embryogenesis showed the presence of meristematic masses which could be reproduced. They are well delimited in the induced calluses on the explants of leaves discs.

The culture medium used contains 2,4-D (4.5 μ M) and kinetin (4.65 μ M).

The embryogenesis potential of these masses allows adopting a new experimental strategy aiming at promoting its expression.

The resumption of meristematic heap with cell proliferation was interesting on a basal medium.

The meristems of small size which are planted out on MS medium have developed the best vitro-plants with an important rooting system and this by using the dumping technic in AIB at 50mg/l. This result suggests that the plantlets acclimatising is promising and shows the regeneration possibility of the *Actinidia* specie.

Key words : *Actinidia* - regeneration organogenesis - somatic embryogenesis- meristeme.

ص خل مل ا

الاكينيديا (الكوي) من النوع المنفصل الجنس الذي ينتمي إلى أسرة Actinidiacées LP الاكينيديا شينسيس *Actinidia chinensis* نكائر بصوبة عن طريق تقنيات التربية التقليدية (الجنسي و اللاجنسي). و الخرض من هذا البحث هو دراسة إمكانيات التجدد وبعض تقنيات الإكثار الدقيق عند الاكينيديا شينسيس *Actinidia chinensis* وهكذا، إلا أننا أثبتنا أن explants مأخوذة من النباتات (فيرو- البذر) أكثر ملائمة لـ organogénèse وتوليد الحرارة على النقيض من explants المأخوذة من البالغين من نفس النبات. من نهاية السنة اظهرت انتشار محتمل من قبل الإبطين مرتفع بما فيه الكفاية في مهدها. الأخصان وسيلة للزرع في وسط بغير إلى منظم النمو هي من نوعية أفضل. و من ناحية أخرى ، النجارب مع cytokinines أو مادة السيتوكينين أظهرت قدرة BAP لتحفيز الإبطين المتفرعة. و مع ذلك ، فإنه يؤدي إلى فقدان فروع ذات جودة للمنتجات. هذه الأخيرة تظهر قوة كبيرة للتجذر في وسط خالي من منظم النمو. اختبارات في نشأة الجنين الجسدية المباشرة و غير المباشرة، قد أظهرت وجود مجموعات من المستنسخات بطريقة méristématique. فهي محددة جيدا داخل الجسامة الناجمة عن explants الاسطوانيات الورقية الوسط المستخدم يحتوي على D-2.4 (4.5 ميكرون م) و الكتينين (4.6 ميكرون م). قدرة الـ Embryogène لهذه المجموعات يمكن أن تعتمد إستراتيجية جديدة لتعزيز التجربة لتعبيرها. استئنافية méristématique مع نكائر الخلية كانت مثيرة للاهتمام في وسط Barlass. Méristème الصغيرة، المزروعة في الوسط MS أعطى نمو أفضل للنباتات مع تجذر أكثر باستخدام تقنية الخمس في 50مل/لتر من AIB هذه النتيجة تشير إلى أن التأطم من النباتات واعدة، ويدل على إمكانية تجديد الاكينيديا (الكوي). الكلمات الرئيسية: الاكينيديا – التجديد – organogénèse -- النخلق الجسدية -- méristème.

INTRODUCTION

L'*Actinidia chinensis* PL. est une plante dioïque. Elle appartient à la famille des Actinidiacées. L'*Actinidia* communément appelé Kiwi est très répandu dans les pays tropicaux et particulièrement en Asie (RAFOLS, 2000). C'est une plante originaire de Chine (SOYEZ, 1971).

L'*Actinidia*, est une liane ligneuse, recouverte de poils. Elle ne présente pas de tronc visible durant les premières années de développement. C'est une espèce ayant les mêmes caractéristiques biologiques et physiologiques que la vigne (*Vitis vinifera*). ZUCCHERELLI, 1981 signale que le seul facteur limitant de sa culture, est l'hygrométrie qui doit être élevée (70 % à 80 %).

L'*Actinidia* commença à faire l'objet d'une culture agricole à partir de 1940 en Nouvelle Zélande, et ce n'est que dans les années 60 que les agriculteurs ont commencé à la cultiver en Europe et aux Etats-Unis en 1968 (FERGUSON, 1983).

Depuis son introduction en Algérie en 1984, l'espèce *Actinidia* s'est bien acclimatée (CHAOUIA 1998). Cet intérêt pour cette culture, repose sur les qualités organoleptiques du fruit et sa richesse en acide ascorbique (vitamine C), glucides et acides organiques (CHAOUIA et al., 2007(a) et CHAOUIA, 2008).

L'introduction du Kiwi sur le marché algérien rentre dans le cadre d'une diversification des produits fruitiers.

Néanmoins, la multiplication traditionnelle (sexuée et asexuée) de l'*Actinidia* est difficile à réaliser.

En effet, lors de la multiplication sexuée, les graines nécessitent une levée de dormance, en outre, les plantules produites sont très hétérogènes. La population obtenue est l'ordre 80 % de pieds mâles et 20% de pieds femelles (LARUE, 1975).

La de multiplication asexuée a l'inconvénient de former un cal à la base de la bouture empêchant ainsi l'émission des racines.

Afin de remédier à ce problème posé par la multiplication de l'*Actinidia chinensis* PL., il est donc indispensable de trouver une méthode de régénération.

Cette méthode permet de reproduire un matériel conforme rapidement et à grande échelle.

A cet effet, un travail expérimental décrit l'ensemble des différentes méthodes utilisées. Elles concernent l'amélioration de la multiplication de l'*Actinidia chinensis* PL. par la technique de la micropropagation. Cette dernière traitera :

- L'organogenèse,
- L'embryogenèse somatique,
- La culture de méristème.

L'objectif visé est l'étude de l'influence et de l'origine du matériel végétal sur la réponse d'une part, à la callogenèse, la caulogenèse, la rhizogenèse le bourgeonnement axillaire et d'autre part, l'embryogenèse somatique (directe et indirecte) et la culture du méristème.

L'étude des facteurs de la régénération et les techniques de la multiplication s'est effectuée sur quelques types d'explants :

- Disques foliaires prélevés à partir de jeunes feuilles excisées,
- Des segments prélevés à partir de pétioles, entre-nœuds, tigelles et cotylédons.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE 1 : GENERALITES SUR L'ESPECE ACTINIDIA

1- Répartition de l'*Actinidia chinensis* PL.

1-1- Dans le monde

L'*Actinidia* est appelé kiwi, groseille chinoise ou encore Yang Tao.

C'est probablement l'espèce fruitière originaire de Chine récemment acclimatée dans le monde hors de la Chine (LIANG et FERGUSON, 1986).

A l'état sauvage, il s'agit de lianes capables de grimper à la cime des arbres et d'étouffer de leurs larges feuilles la végétation avoisinante (BLANCHET, 1995).

Les espèces les plus connues sont *Actinidia chinensis* et *Actinidia deliciosa* à partir desquelles ont été développées la plupart des variétés commerciales d'*Actinidia* ou kiwi.

Le kiwi est un fruit qui, grâce à ses qualités diététiques et organoleptiques, est en expansion particulièrement dans le nord de l'Europe (VASSIERE et al., 1991).

La domestication a commencé en 1904 avec la première introduction de l'espèce *Actinidia deliciosa* en Nouvelle Zélande. Le premier verger commercial a vu le jour en Nouvelle Zélande en 1930 (HEMMERLE, 1977).

Depuis les années 80, la production mondiale de kiwi s'est énormément développée pour atteindre plus de 1.2 millions de tonnes par an (HENNION, 2003).

La France est le 5^{ème} pays producteur mondial derrière l'Italie, la Nouvelle Zélande, la Chine et le Chili (HENNION, 2003). Elle possède un verger non négligeable atteignant 4400 hectares et produisant chaque année de 60000 à 80000 tonnes de fruits (HENNION, 2003).

La variété femelle Hayward est la plus commercialisée dans le monde. Elle présente l'avantage d'avoir de gros fruits (90 à 95g par fruit) et surtout la facilité de conservation qui peut se prolonger jusqu'à 8 mois en chambre froide à 4°C ±1°C (ANGIBOUST, 1981) (Annexe 1).

1-2- En Algérie

Dans le cadre de la diversification des produits fruitiers sur le marché algérien, des espèces fruitières dites espèces 'exotiques' ont été introduites en Algérie et sont à l'état expérimentale à l'ITAF (Boufarik). Parmi elles, l'*Actinidia* de Chine ou kiwi qui a été introduit pour la première fois par le Docteur Trabut en 1958 in BLONDEL et al., (1964) dans le jardin botanique d'Alger (Algérie).

En effet, en 1980 l'Algérie s'est intéressée à cette culture dont les fruits étaient méconnus par le consommateur algérien. Actuellement, l'*Actinidia* s'est bien propagée par

son implantation sur différents sites du nord Algériens, principalement à Blida, Tipaza et Médéa (CHAOUIA, 1998).

2- Botanique et physiologie

L'Actinidia est une plante fructifère de type sarmenteux FOURNIER, (1976). Son nom dérive du grec Aktis (rayons) et fait référence aux nombreuses divisions radiales du style, qui subsistent pendant tout le développement du fruit jusqu'à sa maturation (GIORDANO, 1988).

2-1- Position systématique

L'Actinidia appartient à l'embranchement des spermaphytes. C'est une angiosperme, dicotylédone appartenant à l'ordre des Théales. Cette espèce, fait partie de la famille des Actinidiacées (RAFOLS, 2000).

La famille comprend 36 espèces dont quatre seulement sont comestibles (NIHOUL, 1976) il s'agit de :

- Actinidia chinensis Planchon
- Actinidia deliciosa Planchon
- Actinidia arguta Planchon
- Actinidia kalomikta Planchon

2-2- Système racinaire

L'Actinidia présente un système racinaire peu dense. Il colonise des couches superficielles du sol riche en matière organique et très perméable (ANGIBOUST, 1981 et DERAVEL D'ESCLAPON, 1982).

2-3- Partie aérienne

Pendant les premières années de développement, l'Actinidia ne montre pas un tronc visible. En effet, des rameaux souples sont conduits et soutenus par des tuteurs afin de pouvoir former l'arbre. Néanmoins, selon FOURNIER, 1977_a quatre ou cinq années après leur plantation, les plantes d'Actinidia peuvent laisser apparaître des troncs lignifiés qui présentent un diamètre de 20 à 30 cm.

2-3-1- Branches

Les branches de l'Actinidia sont appelées aussi des sarments pour leur comportement lianoïde comparable à celui de la vigne.

Dans les premières années de leur croissance, les pousses ont un aspect herbacé et sont recouvertes de poils de couleur verte ou rougeâtre selon la variété et la vigueur de la plante.

Les pousses croissent très rapidement ; Elles peuvent atteindre une longueur de dix à douze mètres en un an dans des conditions favorables (FERGUSON, 1984).

2-3-2- Bourgeons

Les bourgeons axillaires naissent sur les nœuds, ils sont protégés du froid par une couche d'écaillés velues. Il existe des bourgeons à bois qui donnent des branches végétatives et

des bourgeons mixtes, ces derniers produisent des branches mixtes, porteuses de fleurs (FOURNIER, 1977_b).

2-3-3- Feuilles

Sur les plantes jeunes, obtenus à partir de semis ou par culture in-vitro, les jeunes feuilles sont plus étroites et lancéolées en comparaison avec celles des plantes adultes (DERAVEL D'ESCLAPON, 1982), qui sont souples, grandes, arrondies et caduques.

2-3-4- Fleurs

L'Actinidia est une plante physiologiquement dioïque. Les fleurs sont d'apparences hermaphrodites (Figure 1) (FOURNIER, 1977_a et DERAVEL D'ESCLAPON, 1982).

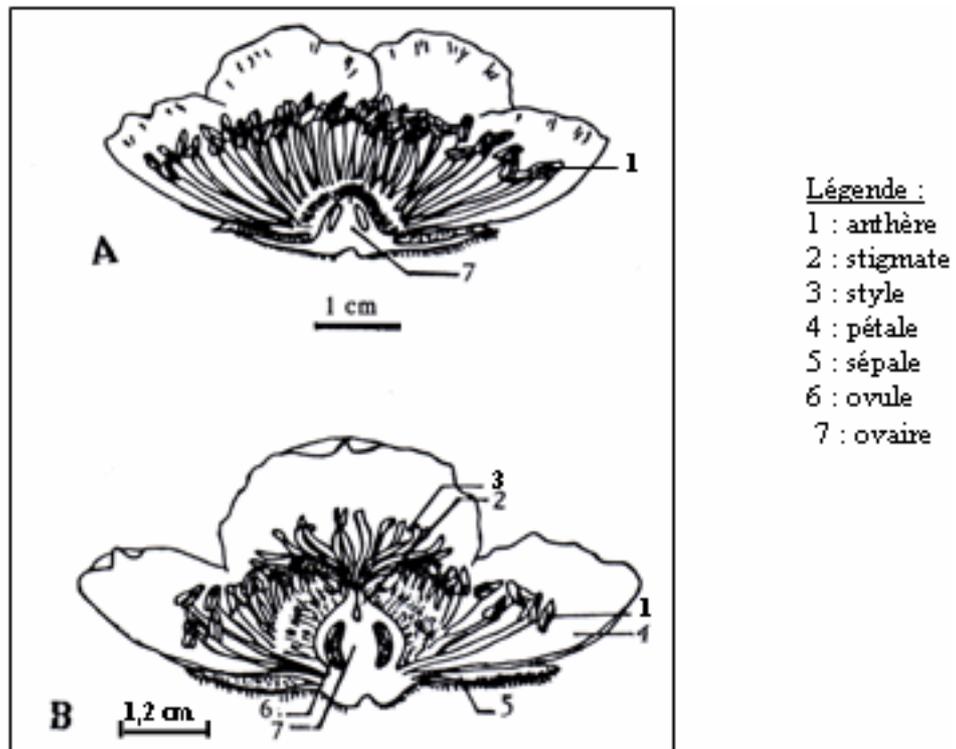


Figure 1 : Section sagittale d'une fleur d'*Actinidia chinensis* PL (CHAOUÏA, 1998). A : fleur mâle B : fleur femelle

Sur les pieds mâles, les fleurs sont isolées ou regroupées en inflorescences. Ces dernières, regroupent 3 fleurs ou plus par aisselle.

Les fleurs femelles sont légèrement plus grandes, ce qui permet de les distinguer des pieds mâles lorsque la plante entre en floraison.

2-3-5- Fruits

Les fruits sont des baies de forme elliptique, ovales et allongées dont le poids et la taille varient en fonction de la variété (NIHOUL, 1976).

Le poids oscille entre 30 et 35g pour la variété Monty et de 120 à 125g pour la variété Hayward (CHAOUÏA, 1998).

L'épiderme du kiwi est d'une couleur marron verdâtre. Il est recouvert de poils marrons qui tombent facilement lorsque le fruit est mûr.

La pulpe est de couleur vert-émeraude, elle est disposée autour de la columelle centrale, partie du fruit dont la couleur est blanc-crèmeux.

La pulpe et la columelle sont comestibles lorsque le fruit est mûr (Figure 2).

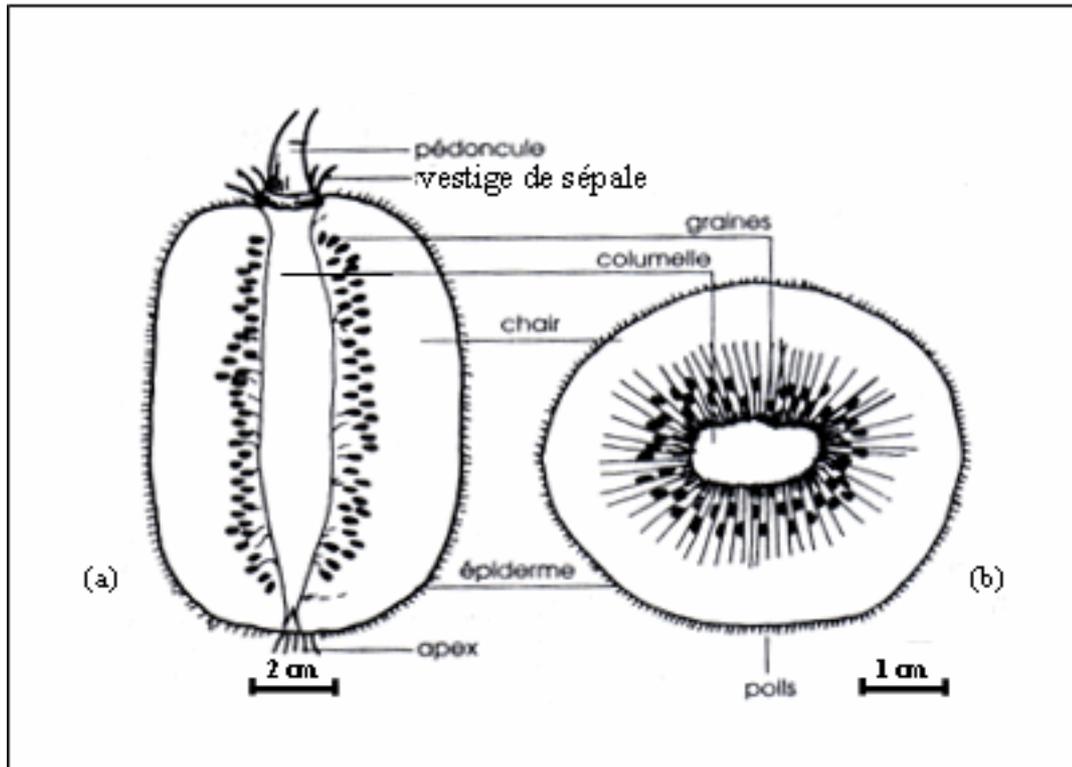


Figure 2 : Coupe longitudinale (a) et transversale (b) du fruit

(CHAOUIA, 1998)

2-3-6- Graines

Lorsque le fruit est encore vert, les graines ont une teinte marron clair, mais sur un fruit mûr, elles sont d'une couleur noir intense.

Elles sont petites et de forme elliptique aplatie, de 2 à 3 mm de long. Elles sont disposées sur deux cercles concentriques tout autour de la columelle. Le nombre de graines par fruit est fonction de la qualité de la pollinisation et de la fécondation. Il varie de cent à mille graines par fruit et même plus. Le poids mille graines est de l'ordre de 1 à 1.5 g FERGUSON, (1983).

Ces graines ne présentent aucune gêne au moment de la consommation du fruit.

2-3-7- Variétés

Le succès de l'Actinidia dépend du choix de la variété la plus apte du point de vue commercial et agronomique (SERRA, 1990).

Afin de choisir la variété à cultiver, il faut connaître, non seulement les conditions environnementales de la région, mais aussi les possibilités productives sur le plan quantitatif et qualitatif.

En effet, le facteur le plus important est la synchronisation de la floraison de la variété femelle et de la variété mâle.

- Variétés femelles

Les variétés femelles les plus connues et diffusées sont : Hayward, Monty, Abbott et Bruno (VITAGLIANO et al., 1983)(Annexe 1).

Selon AGOSTINI, 1995, les variétés femelles d'Actinidia les plus intéressantes ont les propriétés suivantes :

- Rusticité et vigueur,
- Productivité,
- Fruits de taille moyenne à grosse, de forme régulière, ovale ou oblongue, couverts d'une fine pilosité facile à éliminer,
- Pulpe consistante et fondante, de couleur vert-émeraude,
- Saveur équilibrée entre la douceur et l'acidité.

Il est assez simple de reconnaître une variété aux caractéristiques du fruit. Ainsi, trois critères sont à considérer :

- Longueur du pédoncule par rapport au fruit,
- Poids moyen du fruit,
- Forme du fruit.

A ces trois caractéristiques, s'ajoutent les stries, la couleur et la pilosité.

- Variétés mâles

PAILLY et al., (1995) signalent que le critère de distinction le plus fréquent pour classer les variétés porteuses de fleurs mâles concerne la longueur des poils du pédoncule.

Les plants pollinisateurs doivent remplir les conditions suivantes :

- La période de floraison doit être la plus longue possible pour couvrir largement celle des plants femelles,
- Les floraisons doivent être échelonnées et abondantes pour fournir une grande quantité de pollen capable de féconder les plants femelles,
- La floraison doit coïncider avec celle de la variété à polliniser.

Les variétés mâles les plus connues sont : Tomuri et Matua (Annexe 2).

CHAPITRE 2 : TECHNIQUES DE PROPAGATION

1- Méthode traditionnelle

Le semis est un procédé largement utilisé dans la pratique agricole, horticole et forestière, sa pratique dans le cas de l'Actinidia est réservée pour fournir des porte-greffes.

Cette technique est, cependant très coûteuse et peu propice au développement des plantations (LAFON et al. 1998) car les graines de l'Actinidia germent difficilement.

Les premières germinations débutent à partir du 21^{ème} jour et se poursuivent durant plusieurs semaines (NIHOUL, 1976).

De plus, le matériel végétal utilisé pour la reproduction n'est pas homogène. Selon LARUE, (1975), la descendance issue de semis constitue environ 80% de pieds mâles et 20% de pieds femelles.

Une méthode de propagation végétative décrite par RAFOLS, (2000), propose l'utilisation des boutures qui sont enracinées dans un mélange de sable et de tourbe respectivement de 2/3 et 1/3.

Le bouturage peut se faire en utilisant un bois aoûté, ou des tiges herbacées (SALE, 1984).

La bouture aoûtée réussit assez difficilement. En effet, selon MONET, (1976), il se forme le plus souvent un cal à la base du sarment qui empêche l'enracinement.

Selon LARUE, (1975), l'utilisation des hormones de croissance, l'AIB et l'ANA améliorent le taux de reprise des boutures.

Le bouturage en vert est la technique la plus souvent conseillée. Elle a l'avantage de produire un matériel conforme assez rapidement mais elle nécessite un espace important et donne un faible taux de réussite.

Afin d'arriver à un taux de réussite appréciable, il a fallu vaincre l'ensemble de ces obstacles. C'est ainsi, que les chercheurs ont utilisé la technique de la micropropagation par la culture in-vitro. Le clonage se fait en culture aseptique et en conditions de culture contrôlées.

La technique de la culture in-vitro occupe très peu d'espace et permet idéalement d'avoir un taux de propagation élevé sur des périodes très courtes.

Les explants utilisés sont généralement de très petite dimension. Ils facilitent la propagation des clones rares sélectionnés pour une utilisation aux champs.

Enfin, la micropropagation permet l'obtention de matériel sain (GEORGE, 1993 et PIERIK, 1997).

2- Micropropagation par bouturage

Cette forme de multiplication végétative permet de reproduire des plants génétiquement et physiologiquement identique.

Elle a l'avantage aussi de reconstituer une population d'individus tous semblables (ESPINOZA et al., 1986).

La micropropagation chez l'espèce Actinidia est le procédé qui consiste à cultiver des boutures herbacées sur un milieu avec ou sans hormones.

Dans le cas de la vigne, il est possible d'obtenir jusqu'à 10000 plants en une année (FOURNIOUX et al., 1998).

3- Bourgeonnement axillaire

Cette technique consiste à promouvoir le développement de bourgeons axillaires présents à l'aisselle des feuilles. Ces dernières sont localisées au niveau des extrémités apicales des tiges. Ainsi, la dormance apicale est levée.

Sous l'influence de fortes concentrations en cytokinines, les bourgeons sont affranchis de la dominance apicale et forment de petits rameaux axillaires. Ces mêmes rameaux peuvent à leur tour servir d'explant pour un nouveau cycle de multiplication lors de leur enracinement dans un milieu adéquat, souvent enrichi en auxine (Wickson et Thimann, (1958) cité par FLEGMANN et WAIN WRIGHT, (1981) ; PIERIK, (1997).

Cette technique est l'une des méthodes la plus importante de la multiplication in-vitro.

Elle présente plusieurs avantages dont la simplicité, le taux de multiplication relativement élevé et la préservation de la stabilité génétique (conformité du clone au plant mère) (PEIRIK, 1997).

Le milieu de multiplication peut être enrichi par une cytokinine ou une substance à action de cytokinique (comme le thidiazuron (TDZ) ou le N-(2-chloro-4-pyridyl)-N'phenylurée (CPPU)) (MOK et al., (1982) ; FELLMAN et al., (1987) ; PREECE et al., 1987 ; GRIBAUDO et FRONDA, (1991) ; HUETTEMAN et PREECE, (1993).

GEORGE, (1993) ; HUANG et al., (1998), BATCH et al., (1998) signalent que la réponse de l'explant au taux de multiplication et à la vitrification des rameaux axillaires est fonction de l'application des cytokinines et génotype.

Le TDZ semble avoir une efficacité plus grande sur la multiplication lorsqu'il est utilisé à faible concentration (CHALUPA, (1987) ; PREECE et al., (1987) ; HUETTEMAN et PREECE, (1993).

4- Embryogenèse somatique

L'embryogenèse somatique est un processus par lequel des cellules somatiques subissent une séquence de développement similaire à celle d'un embryon zygotique (YEUNG, 1995).

Cette technique présente une large propagation surtout chez les monocotylédones (TRAN THANH VAN, 1992).

Cependant, les gymnospermes ne répondent pas favorablement à l'obtention de génération d'embryons somatiques (HASSIG, 1989).

WILLIAMS et MAHESHWARAN, (1986) signalent qu'une revue scientifique fait mention d'une vingtaine d'espèces ligneuses capables de révéler une potentialité embryogène, souvent décelée à partir d'embryons zygotiques.

Chez les arbres fruitiers comme le pommier (*Malus pumila*) et le poirier (*Pyrus communis*), des générations ont été obtenues avec une vingtaine de cultivars et de porte-greffes (JONES, 1991).

De même, l'embryogenèse somatique in-vitro a été expérimentée sur une quarantaine de génotypes appartenant au genre *Vitis*.

Des embryons somatiques ont été obtenus également avec des essences forestières telles que le chêne vert (*Quercus ilex*) (FERAUD-KELLER et al., 1988) le châtaignier (*Aesculus hippocastanum*) (Dameri et al. in JONES, 1991) et le peuplier (*Populus alba*) (LEE STADELMANN, 1989).

Différents explants présentent des potentialités embryogéniques tels que, les limbes, les pétioles et les fleurs (Ovaires, ovules et anthères) (LEBRUN, 1986).

En général, les embryons sont régénérés à partir de tissus de feuilles ou de segments de pousses avec passage ou non par un cal, en présence du 2.4-D et sur un milieu de MURASHIGE et SKOOG, (1962).

Souvent, une cytokinine (BAP ou Kin) est nécessaire au développement de embryons jusqu'au stade cotylédonaire.

Cette constatation a été rapporté pour la vigne (*Vitis vinifera*) par RAJASEKARAN et al., (1988). Elle a été également confirmée pour le chêne vert (*Quercus ilex*) par FERAUD-KELLER et al., (1988).

Les gibbérellines sont rarement utilisées dans les milieux de culture initiaux. Elles peuvent être utilisées pour lever la dormance de certains embryons somatiques (KAVATHEKA et al., 1978)

Les annexes 3 et 4 présentent des exemples de traitements d'inductions pour l'obtention de l'embryogenèse somatique avec divers explants (FOURNIOUX et LANGILIER, 2004).

5- Culture de méristème

Cette technique nouvellement appliquée aux espèces ligneuses a été rapportée par MC COWN et al., (1987) AITKEN-CHRISTIE et al., (1988) et WARRAG et al., (1991).

Les méristèmes sont constitués de massifs de cellules non différenciées qui conservent la capacité de se diviser activement (ZRYD, 1988).

L'objectif de la culture de méristème est d'obtenir in-vitro, une petite plante dotée d'une tigelle, de jeunes feuilles et de radicules. Après sevrage, elle sera transplantée en plein champ (MARTIN, 1984) (Tableau 1).

MOREL et MARTIN, (1952) ont montré qu'il était possible d'obtenir des clones sains à partir de plants virosés par la culture in-vitro des méristèmes sur le Dahlia (*Dahlia lilliputs*) et la pomme de terre (*Solanum tuberosum*).

Pour conserver un matériel sain, il faut absolument les protéger contre les contaminations

Quant à MARTIN, (1984), il signale que les plantes obtenues par culture de méristème ne sont pas résistantes aux virus. Elles sont aussi sensibles que leurs parents.

La plante obtenue par culture du méristème n'est pas immunisée contre le parasite qui peut se déclarer en plein champ (CHARBONNIER et al., 1988).

Pour cela, la thérapie est maintenant fréquemment associée aux cultures de méristèmes dont le principe consiste à soumettre les méristèmes après excision à une température létale pour lutter contre le virus. Cette température est compatible avec la survie de l'explant.

La thérapie consiste à appliquer des chocs thermiques de longues durées à $37 \pm 1^\circ\text{C}$ ou très brefs à $50 \pm 1^\circ\text{C}$ (SCRIBAN, 1999).

Selon BOCCON, (1999), les risques de contamination augmentent proportionnellement avec la taille des méristèmes.

Notons par ailleurs, que BOUBAKER, (1996) ; a pu obtenir des plantules saines à partir de cépages atteints de la dégénérescence infectieuse (court- noué) de la vigne (*Vitis vinifera*) par la culture de méristème en utilisant deux ébauches foliaires de 0,1 à 0,2 mm de long.

Vitro- méthodes	Avantages	Inconvénients
Micro- bouturage	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Une taille plus ou moins importante de l'explant ➤ Exécution facile ➤ Milieu de culture moins exigeant 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Difficulté de désinfection ➤ Inhibition de l'organogenèse à partir de vieux sujets, avec sécrétion de phénols
Micro- greffage	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Meilleure reprise que la culture de méristème par la présence d'un support naturel ➤ Tissus en général indemne de pathogène 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Difficulté de manipulation ➤ Risque d'incompatibilité entre le génotype du porte-greffe et celui de greffon
Culture de méristèmes	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Obtention de culture indemne de pathogènes ➤ Réactivation organogène 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Manipulation difficile ➤ Taux de reprise assez faible
Embryogenèse somatique	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Obtention d'embryon à partir de cellules somatiques ➤ Descendance génétiquement identique à la plante- mère 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Très délicate ➤ Variations somaclonales parfois désavantageuses

Tableau 1 : Méthodes de micropropagation

(HAICOUR, 2002)

6- Culture de protoplastes

Les protoplastes peuvent être isolés à partir des tissus de différents organes (cals, cotylédons, feuilles, apex caulinaires ou racinaires, segments de tige et entre- nœuds).

Ces protoplastes synthétisent une nouvelle paroi et peuvent régénérer une plante entière dans des conditions appropriées de culture.

BINDING, (1985) et MAHESHWARI et al., (1986) ont répertorié une centaine d'espèces qui ont régénéré des plantes à partir de protoplastes.

Des procédés de régénération ont été développés chez les espèces ligneuses notamment le Kiwi (*Actinidia chinensis* PL.) ROEST et al., 1989).

Des méthodes analogues ont été développées pour le peuplier (*Populus alba*), l'orme (*Ulmus campestris*), différentes rosacées (*Malus pumila*, *Prunus cerasifera* et *Pyrus communis*) et les rutacées (*Citrus limon* et *Citrus aurantifolia*).

Les régulateurs de croissance sont utilisés pour chaque étape (survie des protoplastes, induction mitotique, callogenèse et organogénèse) à des concentrations variables suivant les espèces.

La régénération des ligneux à partir de protoplastes reste cependant difficile, car plusieurs facteurs restent à maîtriser (ROEST et al., 1989).

7- Sexage chez l'Actinidia

Dans les espèces sauvages s'observe une immense diversité, la domestication s'est réalisée à partir d'un faible nombre d'individus rendant la base génétique des variétés commerciales de kiwi très étroite (FERGUSON et al., 1997).

Le genre *Actinidia* est représenté par un nombre élevé d'espèces dioïques répondant à des exigences écologiques très variées. La plus connue est la variété femelle Hayward qui assure la plus grande part de la production fruitière. Les deux cultivars mâles les plus couramment plantés sont Matua (floraison précoce) et Tomuri (floraison plus tardive).

Devant l'importance que revêt l'évolution du kiwi qui reste une culture monoclonale, des problèmes d'ordre commercial et phytosanitaire peuvent apparaître à plus ou moins court terme.

En outre, l'appel du gain fait que l'implantation du kiwi se fait dans des sols dont la texture est inappropriée à l'évolution de cette plante (problème d'hygromorphie plus ou moins élevée, problème de « fatigue des sols » après arrachage des vignes ou de pêchers notamment).

L'espèce *Actinidia chinensis* est généralement diploïde ($2n= 58$), néanmoins il existe certains individus tétraploïdes avec $2n= 116$.

L'espèce *Actinidia deliciosa* est hexaploïde ($2n= 174$) (AINSWORTH, 2000).

Pour ces raisons, depuis 1989 un programme de recherche et d'amélioration génétique de l'*Actinidia* est engagé. Il conduira à sélectionner de nouveaux cultivars mâles et femelles et de nouveaux porte-greffes (ROCCA SERRA, 1990).

Des tests de sexage au stade plantule est plus que nécessaire (CHALAK, 1996). Pour cela, la mise au point d'une technique PCR-RAPD en vue de caractériser des clones d'*Actinidia* différents par leur performance est en cours (CHAOUIA, 2007_b).

Conclusion

La régénération in- vitro permet la multiplication en masse d'un clone dans un espace limité sur de courtes périodes (GUILLAUM, 2001).

L'espoir suscité par la culture in-vitro était de remédier au vieillissement physiologique des arbres. Elle permet aussi la multiplication et la conservation des espèces rares.

Cette technique utilise des tissus tels que les méristèmes supposés en totipotence.

Ces cellules sont capables de se différencier en tissus différents, comme le feraient les cellules embryonnaires (NANSON, 2004).

La stabilité génétique en culture in- vitro est en fonction de l'espèce. Elle est extrêmement variable selon les plantes (KASMICHE, 1994).

La conservation des ressources génétiques de l'Actinidia ne peut se concevoir sous forme de banque de gènes de graines vu son hétérozygotie. La conservation se fait sous forme de plantes vivantes.

Les méthodes de conservation sont nombreuses, nous citons les plus utilisées (THIS, 2002) :

- la Collection des clones et des variétés
- La Conservation des génotypes in-vitro, avec l'utilisation de la thermothérapie
- La plus prometteuse, est la technique de la cryoconservation (ZRYD et al., 1988).

Le risque de la multiplication en culture in-vitro est la perte de conformité variétale. Il y'a apparition dans certains cas d'individus nettement différents désignés sous le nom de variants.

Ces variants sont assez fréquemment observés dans les cas de régénération de bourgeons à partir d'un cal. Leur formation paraît être favorisée par l'utilisation de régulateurs de croissance (HUGUIN, 1998).

MATERIEL ET METHODES

Les techniques de micropropagation exploitées au cours de cette thèse sur l'espèce *Actinidia chinensis* PL. sont :

Chapitre 1 : Organogenèse

Chapitre 2 : Embryogenèse somatique

Chapitre 3 : Culture de méristèmes

Nous avons étudié trois sortes de matériel végétal :

- Un matériel végétal jeune issu de vitro-semis à partir de graines d'*Actinidia* de la variété Hayward.
- Un matériel végétal prélevé sur des plantules d'un an installées sous serre (Variétés femelles et mâles).
- Un matériel végétal prélevé en plein champ sur des pieds d'*Actinidia* de la variété femelle Hayward âgés de 20 ans.

1- Site de prélèvement et lieu de travail

Le matériel végétal prélevé pour notre expérimentation provient de la station expérimentale ITAF (Boufarik, Algérie). Les plantes d'*Actinidia chinensis* PL sont cultivées dans un verger (1.5 ha) et dans une serre en polyéthylène d'une capacité de 144 m² (CHAOUIA, 1998).

Les différentes analyses que nous avons effectuées au cours de notre travail se sont déroulées :

- Laboratoire de physiologie végétale et d'amélioration des plantes (Blida, Algérie),
- Laboratoire de physiologie végétale de Purpan (Toulouse, France),
- Laboratoire de cytologie de Senia (Oran, Algérie),
- Laboratoire des biotechnologies végétales (Cluj-Napoca, Roumanie).

2- Matériel végétal

2-1- Graines

Les graines utilisées pour la culture in-vitro proviennent de la variété Hayward. Elles sont extraites des fruits mûrs récoltés aux mois de décembre sur deux campagnes 2005/2006 et 2006/ 2007 (figure 3).

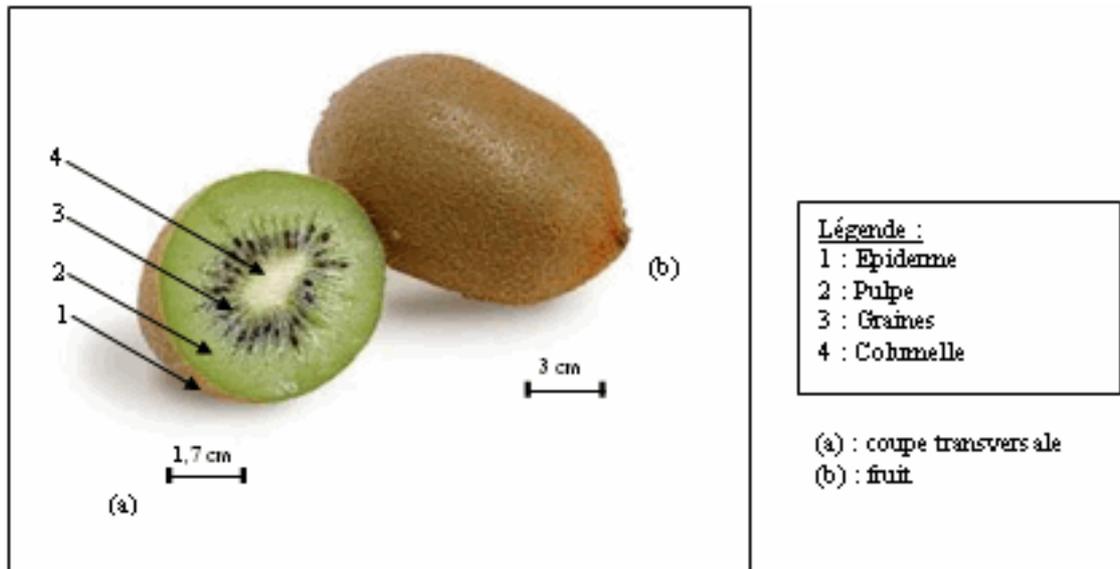


Figure 3 : Fruit d'Actinidia : variété Hayward Parcelle de Boufarik (Algérie).

Les deux origines de graine sont :

- Graines extraites des fruits provenant du verger de la station expérimentale ITAF (Boufarik, Algérie).
- Deux lots de graines extraites des fruits provenant de la station de Jourdain (Toulouse, France).

Les graines ont subi un traitement au froid à une température de $4 \pm 1^\circ\text{C}$ à $5 \pm 1^\circ\text{C}$ pendant deux semaines afin de lever la dormance (LAFON et al., 1998).

2-1-1- Désinfection des graines

Elle s'est déroulée sous une hotte stérile selon le protocole suivant :

- Trempage dans l'alcool 70° pendant 10 mn,
- Trempage dans l'hypochlorite de sodium (NaOCl à 8 %) pendant 10 mn,
- Trois rinçages successifs de 5 mn à l'eau distillée stérile afin d'enlever toute trace d'hypochlorite de sodium.

2-1-2- Germination et repiquage

Au préalable, les boîtes de Pétri, les tubes et les bocaux de culture utilisés pour la germination sont stérilisés par autoclavage durant 20 mn à une température de $120 \pm 1^\circ\text{C}$ et à une pression de 1 kg/cm^2 .

Les boîtes de Pétri sont tapissées par 3 feuillets de papier Chardin dont l'épaisseur est de 70 mm chacun. Ils sont imbibés par 10 ml d'eau distillée stérile.

Ensuite 20 à 30 graines sont déposées pour une pré-germination dans chaque boîte de Pétri (Figure 4).

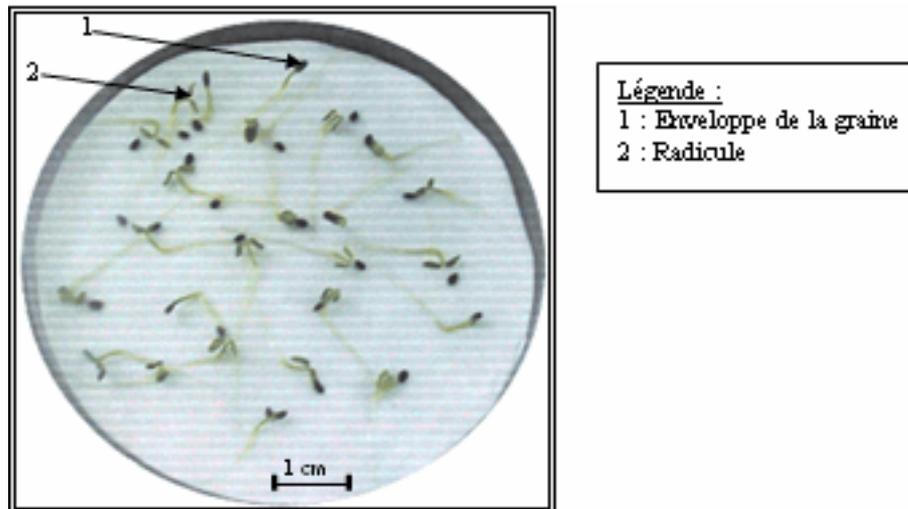


Figure 4 : Prégermination des graines d'Actinidia

Les boîtes de Pétri sont fermées hermétiquement et installées dans la chambre de culture sous les conditions suivantes :

- Une photopériode de (PP) de 16 heures d'éclairage blanc et 8 heures d'obscurité. L'éclairage est fourni par une série de lampes metalarc de type Silvianade 36W. chacune. L'intensité de l'éclairage varie de 38 à 62 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{sec}$.
- Une température de 25°C \pm 1°C.

Etant donnée la lenteur du processus de germination des graines (entre 21 et 25 jours) et pour éviter leur dessèchement, une réimbibation hebdomadaire à l'eau distillée stérile est effectuée à raison de 5 ml d'eau distillée par boîte de Pétri.

Après une période de 25 jours, correspondant à l'apparition des jeunes feuilles, les plantules sont transférées dans des tubes de culture contenant 20 ml du milieu de MURASHIGE et SKOOG (1962) (MS) : M₁.

Le milieu M₁ permet au vitro-semis de poursuivre leur développement (Figure 5).

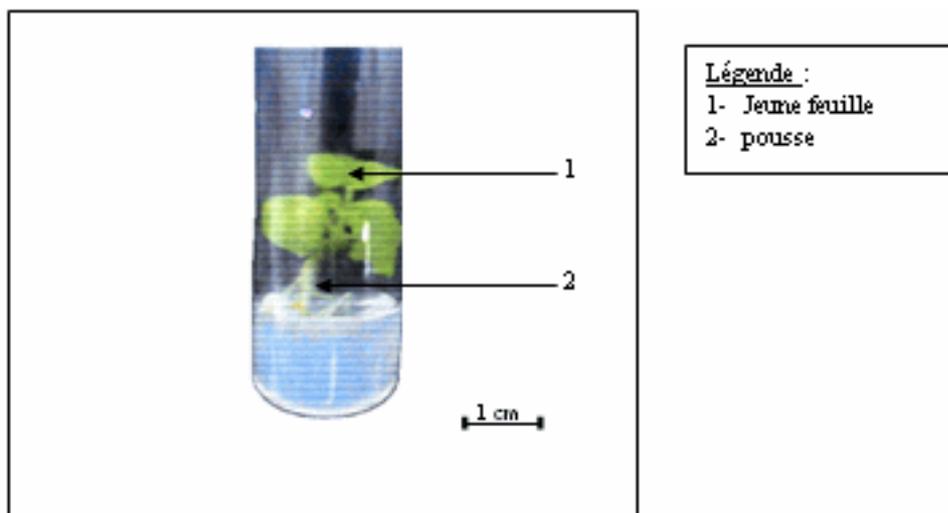


Figure 5 : Vitro- semis de 40 jours (Milieu M₁)

Les tubes (figure 5) sont placés dans la chambre de culture sous les mêmes conditions de photopériode et de température que celles utilisées pour la pré-germination des graines, pour une durée de 40 jours (Figure 6).

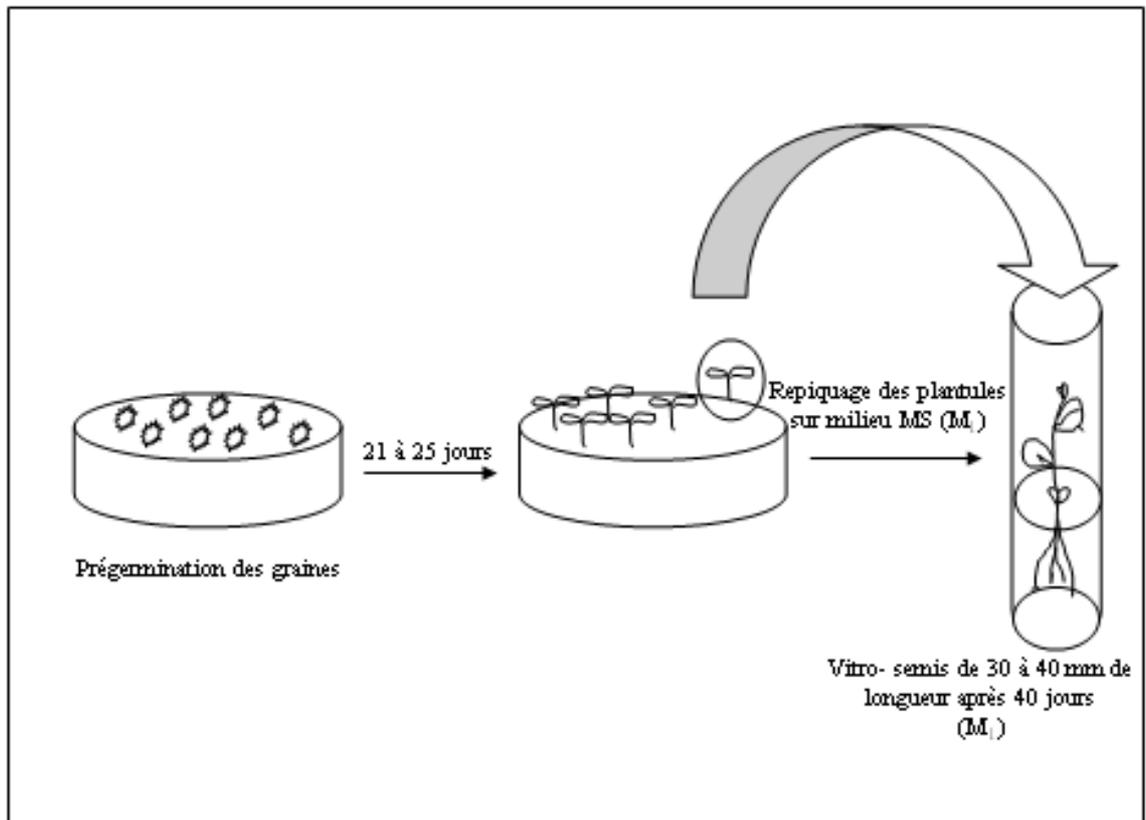


Figure 6 : Procédé de la phase de la germination des graines d'Actinidia en conditions stériles.

2-2- Matériel végétal prélevé in- situ

Le matériel végétal est prélevé sur des plantules (Variétés mâles et femelles) âgées d'une année. Ces plantules évoluaient sous serre au niveau de la station de l'ITAF.

Un autre prélèvement s'est effectué sur des arbres d'*Actinidia* adultes âgés de 20 ans (Verger de la station expérimentale de Boufarik). L'échantillonnage est réalisé sur la variété Hayward au mois de mai, période à laquelle l'arbre est physiologiquement actif (pleine végétation). Il concerne des pousses herbacées et feuillées (Figure 7) :

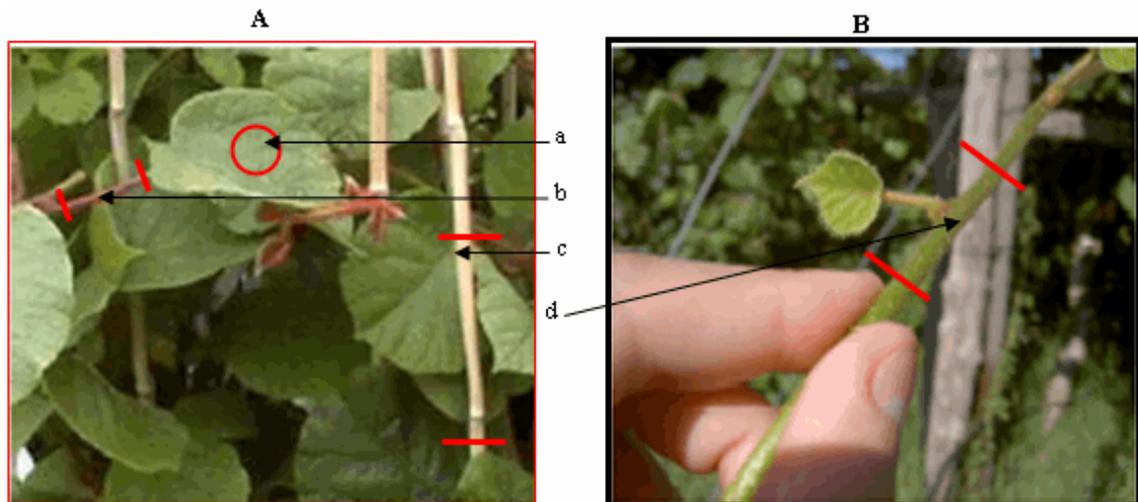


Figure 7 : Matériel végétal utilisé (variété Hayward) A : Poussettes herbacées au mois de mai B : Prélèvement d'une bouture.

2-2-1- Nature des explants

Différents types d'explants sont utilisés :

- Boutures herbacées de 30 à 40 mm de long (Figure 7c),
- Fragments d'entre-nœuds de 20 mm de long (Figure 7d),
- Fragments de pétioles de 50 mm de long (Figure 7b),
- Disques foliaires de 10 mm de diamètre (Figure 7a).

2-2-2- Désinfection

Les boutures herbacées, les entre nœuds et les pétioles subissent le même type de désinfection. En l'occurrence, un trempage rapide de 3 secondes dans l'alcool à 70°, puis dans NaOCl à 6 % pendant 15 mn, suivi par 5 rinçages successifs à l'eau distillée stérile.

Les jeunes feuilles prélevées subissent un trempage de 2 à 3 secondes dans l'alcool à 70° puis dans NaOCl à 4 % pendant 10 mn. Les jeunes feuilles sont ensuite rincées abondamment à l'eau distillée stérile afin d'éliminer toute trace de NaOCl et d'éviter ainsi les brûlures.

3-Interprétation statistique

Nous avons réalisé un traitement statistique des données des trois chapitres (Organogenèse, embryogenèse et culture de méristème).

Les programmes ont été conçus pour réaliser une analyse de la variance à deux voies.

La signification des différences entre les traitements est exprimée en fonction de la probabilité (P).

$P > 0.05$: différence non significative

$P < 0.05$: différence significative

$P \leq 0.01$: différence hautement significative

$P \leq 0.001$: différence très hautement significative

Le test de Newman et Keuls 1962 in DAGNELIE, 1980 au seuil de 5 % a été utilisé pour le classement des moyennes.

Les pourcentages 0 et 100 ont subi respectivement la transformation $(1/4n)$ et $(1-1/4n)$ où n , étant le nombre d'explants mis en culture. Les pourcentages ont subi la transformation $\arcsin \sqrt{P}$ avant de procéder à l'analyse de variance.

4- Prise des photographies

Les photos prises au microscope optique sont réalisées avec un appareil NikonTM, en position ISO 64 avec un voltage de 6 et 8 V. Le microscope est muni d'un filtre bleu.

Le film utilisé est du type FujifilmTM Professional, 64T, type II.

CHAPITRE 1 : ORGANOGENESE

L'organogenèse in-vitro dérive d'un phénomène naturel du clonage végétal. Des explants végétaux sont cultivés stérilement sur un milieu artificiel et dans un environnement contrôlé.

Suite aux sub-cultures successives, des plantules identiques à la plante de départ sont obtenues.

La propriété de la totipotence des cellules végétales est alors exploitée.

Le choix des concentrations, des combinaisons ou éventuellement des séquences de régulateurs de croissance, est essentiel pour le déclenchement et la régulation de l'organogenèse (MARGARA, 1990).

Le milieu de base utilisé au cours de l'expérimentation dans ce chapitre est le milieu M₂ : (MS) + vitamines de Morel 1952 in GAUTHERET, 1959). A ce milieu de culture de base (M₂) a été additionné différentes combinaisons hormonales selon l'induction traitée.

Trois types d'explants ont été testés pour les vitro-semis et pour le matériel végétal prélevé in-situ, il s'agit de :

- Fragments de pétioles,
- Disques foliaires,
- Segments d'entre-nœuds,

La figure 8 regroupe les étapes de mise en culture des explants utilisés.

1- Milieu destiné à induire la callogenèse

Afin de provoquer la callogenèse, nous avons utilisé comme auxines le 2.4-D et l'AIA et comme cytokinines la kin et la BAP dans un milieu gélosé.

Les milieux sont aseptiquement répartis à raison de 40 ml par boîte de Pétri.

Les concentrations utilisées sont mentionnées dans le tableau 2. Nous avons utilisé 25 boîtes de Pétri par traitement pour chaque explant.

Milieu de culture	M ₂ C ₀	M ₂ C ₁	M ₂ C ₂	M ₂ C ₃	M ₂ C ₄	M ₂ C ₅	M ₂ C ₆
Traitement (Milieux)	M ₂ (Témoin)	M ₂ + lmg/l (2.4-D)	M ₂ + lmg/l (2.4-D)+ lmg/l (kin)	M ₂ + lmg/l (2.4-D) + lmg/l (BAP)	M ₂ + lmg/l (AIA)+ lmg/l (kin)	M ₂ + lmg/l (AIA)+ lmg/l (BAP)	M ₂ + lmg/l (AIA) + lmg/l (2.4-D)

Tableau 2 : Traitements induisant la callogenèse

2- Milieu destiné à induire la caulogénèse

L'auxine utilisée pour induire le bourgeonnement est l'AIA à 0.5 mg/l. Les cytokinines utilisées sont la kin et la BAP. Le milieu de culture est réparti à raison de 10 ml/ par tube de culture.

Ainsi, pour chaque explant, nous avons utilisé 25 tubes de culture par traitement. Ils sont préalablement stérilisés par autoclavage. Les différents milieux utilisés figurent dans le tableau 3.

Milieu de culture	M ₂ B ₀	M ₂ B ₁	M ₂ B ₂	M ₂ B ₃	M ₂ B ₄
Traitement (Milieux)	M ₂ (Témoin)	M ₂ + 0.5mg/l (AIA) +1mg/l (BAP)	M ₂ + 0.5mg/l (AIA)+ 2mg/l (BAP)	M ₂ + 0.5mg/l (AIA)+ 1mg/l (kin)	M ₂ + 0.5mg/l (AIA)+ 2mg/l (kin)

Tableau 3 : Traitements induisant la caulogénèse

3- Milieu d'allongement des pousses feuillées

L'action de la gibbérelline semble s'exercer au niveau de la zone du méristème, initiatrice des ébauches foliaires (anneau initial) (ABDUL HUSSAIN et ABDUL HUSSAIN, 2004).

La gibbérelline utilisée est l'AG₃ associée à la cytokinine (BAP) (Tableau 4).

Milieu de culture	M ₂ A ₀	M ₂ A ₁	M ₂ A ₂
Traitement (Milieux)	M ₂ (Témoin)	M ₂ + 1mg/l (AG ₃)	M ₂ + 1mg/l (AG ₃) + 1mg/l(BAP)

Tableau 4 : Traitements induisant l'allongement des pousses feuillées.

Le milieu est réparti dans des tubes de culture à raison de 10 ml de milieu par tube. Nous avons réalisé 25 répétitions par explant et par traitement.

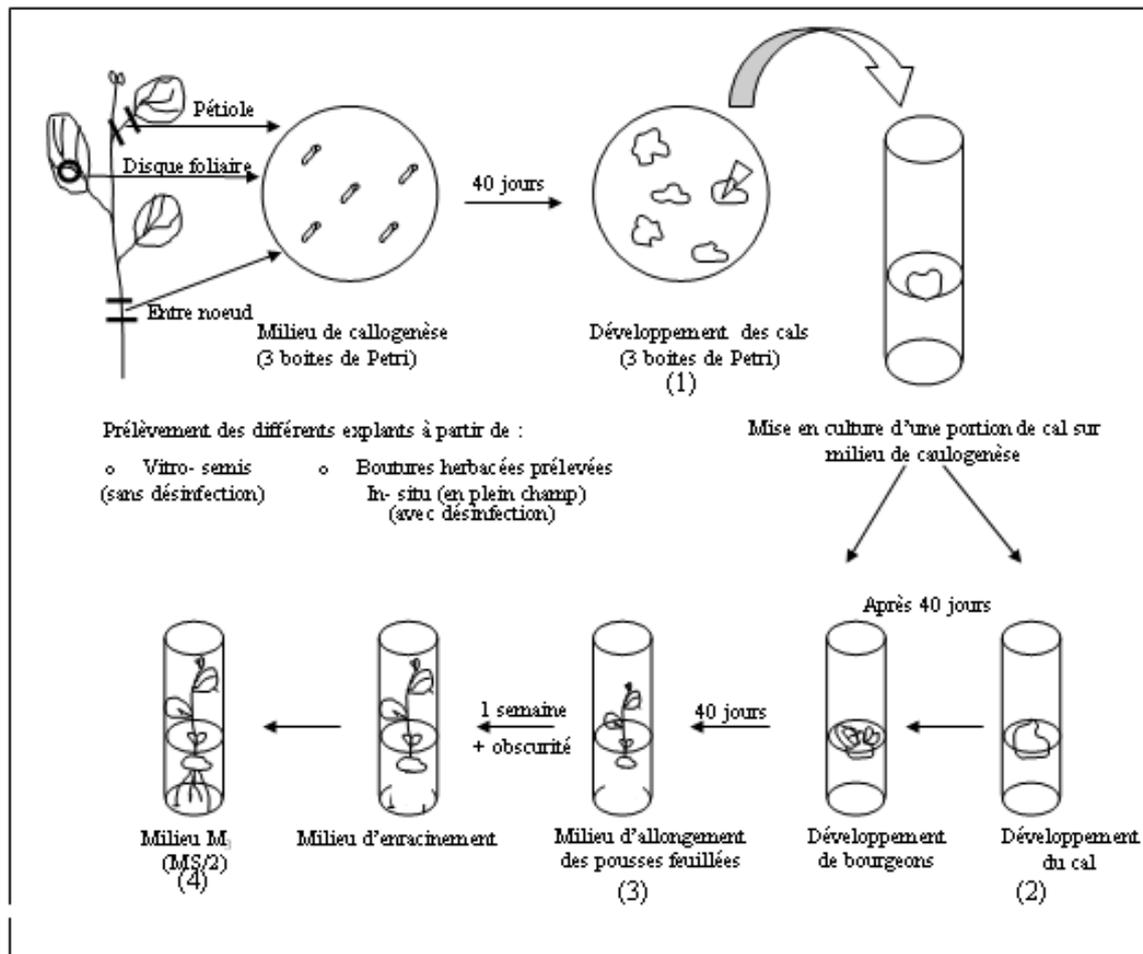


Figure 8 : Principales étapes de mise en culture des différents explants de l'espèce *Actinidia chinensis* PL

4- Milieu d'enracinement

Le milieu de base (témoin) utilisé est le milieu de MURASHIGE et SKOOG (1962) dilué de moitié : M₃ (MS/2 ou M₁/2). L'auxine utilisée est l'AIA, en combinaison avec les cytokinines (BAP ou kin) (Tableau 5).

Milieu de culture	M ₃ R ₀	M ₃ R ₁	M ₃ R ₂	M ₃ R ₃
Traitement (Milieux)	M ₃ (M ₁ /2) (Témoin)	M ₃₊ 0.5mg/l (AIA)	M ₃₊ 0.5mg/l (AIA) +0.25mg/l (BAP)	M ₃₊ 0.5mg/l (AIA) + 0.25mg/l (kin)

Tableau 5 : Traitements induisant l'enracinement.

5- Conditions de culture

Pour les trois premières parties qui correspondent à la callogenèse, le bourgeonnement et l'allongement, les boîtes de Pétri et les tubes de culture sont installés dans la chambre de culture.

La température est de 25°C±1°C et la photopériode est de 16 heures de lumière blanche et 8 heures d'obscurité.

Afin de stimuler la rhizogenèse, les tubes sont d'abord placés à l'obscurité pendant une semaine pour être transférés après sur le milieu M₃ (M₁/2) sans hormone. Ils sont ensuite placés sous les mêmes conditions de culture que les étapes précédentes (callogenèse, caulogenèse et allongement des pousses).

6- Paramètres étudiés

- Pourcentage de callogenèse (%),
- Calcul du poids frais et poids sec induisant la callogenèse et la caulogenèse (mg),
- Description et aspect des cals (callogenèse et caulogenèse),
- Pourcentage de cals avec pousses feuillées (%),
- Longueur des pousses feuillées (mm),
- Pourcentage de pousses feuillées avec présence de radicules (%).

7- Bourgeonnement axillaire

Les essais effectués sont réalisés avec des extrémités apicales comme explants. Ils proviennent de plantules de deux âges différents à savoir 8 semaines et 16 semaines. Les plantules sont issues d'un lot de graines. Ces dernières, sont extraites de fruits mûrs récoltés durant la campagne 2005/2006 à la station de Boufarik. Il s'agit des arbres d'Actinidia âgés de 20 ans de la variété Hayward. Une tentative d'enracinement des pousses obtenues est ensuite initiée.

Un essai a également été entrepris avec un autre lot de graines extraites des fruits mûrs (campagne 2005/2006) provenant de la station de Jourdain (Toulouse, France).

Il s'agit des arbres d'Actinidia âgés de 45 ans de la variété Hayward. Cependant, des problèmes d'infection fongique qui ont apparus ont entraîné l'abandon de l'essai.

7-1- Plantules âgées de 8 semaines

La stérilisation des graines est effectuée selon la technique décrite au point 2-1-1. Dans cet essai les graines sont mises à germer dans des bocaux. Ces derniers ont une capacité de 500 cm³. Chaque bocal contient 100 cm³ de perlite et 50 ml de milieu M₄ (GMS) liquide (annexe 5). Le nombre de graines semées est de 20 à 30 par bocal.

Ce milieu est dépourvu de saccharose et de gerlite. Les bocaux sont préalablement stérilisés par autoclavage.

Le substrat est recouvert d'un papier aluminium lors de l'autoclavage pour limiter l'évaporation du milieu de culture.

A partir de plantules âgées de 8 semaines, les extrémités apicales qui présentent au moins 2 jeunes feuilles bien étalées et dont la longueur est de 10 mm sont prélevées.

Elles sont mises en culture dans des tubes de culture contenant un milieu de base M₄ : (GAMBORD (1968) et MURASHIGE et SKOOG (1962) : (GMS) en combinaison avec les auxines et les cytokinines (Tableau 6).

Chaque tube de culture contient un explant (soit 25 tubes par traitement) (Tableau 6).

Milieu de culture	M ₄ Ba ₀	M ₄ Ba ₁	M ₄ Ba ₂	M ₄ Ba ₃	M ₄ Ba ₄	M ₄ Ba ₅
Traitement	M ₄ (GMS) (Témoin)	M ₄ + 0.5 μM (kin)	M ₄ + 5μM (kin)	M ₄ +2.5μM (AIA)	M ₄ + 5μM (AIA)	M ₄ + 5μM (BAP)

Tableau 6 : Organisation des traitements de bourgeonnement axillaire Extrémités apicales issues de plantules âgées de 8 semaines.

Des essais de sub-cultures sur des rameaux axillaires produits ont eu lieu. Ils ont pour but d'évaluer le potentiel de multiplication.

Les étapes des différentes sub-cultures ainsi que les données lors de chaque repiquage sont mentionnées en annexe 6.

Lors des repiquages, l'explant sur lequel sont produits, plusieurs rameaux est éliminé.

L'explant n'ayant pas produit de rameaux axillaires et/ou présentant un aspect nécrosé ou vitrifié est écarté. L'explant n'ayant produit que des cals à la base est également écarté.

Pour chaque explant restant, 3 rameaux sont repiqués.

Le milieu M₄Ba₆ (M₄ + 5,37 μM NAA) permet l'enracinement des explants.

Le milieu M₄Ba₇ (M₄ + macro de Gambord (dilué 2x) + 5,37 μM (NAA) + 2 g/l de charbon actif) représente un second essai pour tenter d'améliorer le taux d'enracinement. Le

charbon actif est ajouté avant autoclavage et nécessite une agitation régulière du milieu pendant son refroidissement afin d'éviter la précipitation.

Il faut mentionner qu'au cours de cette dernière étape la température de la chambre de culture a été abaissée par nos soins de manière intempestive de $26 \pm 1^\circ\text{C}$ à $18 \pm 1^\circ\text{C}$.

Les différents essais effectués pour l'enracinement des rameaux axillaires sont notés dans l'annexe 6.

7-2- Plantules âgées de 16 semaines

Les étapes qui aboutissent à l'obtention de plantules sont identiques à celles décrites au point 7-1. Après 16 semaines de culture à $26 \pm 1^\circ\text{C}$ et une PP de 16 heures, les extrémités apicales d'environ 10 mm avec au moins 2 jeunes feuilles bien développées sont excisées à partir des plantules.

La culture se fait à nouveau dans des tubes de culture à raison 25 tubes par traitement. Ces derniers sont au nombre de 4 (Tableau 7).

Milieu de culture	M ₄ Ba ₀	M ₄ Ba ₅	M ₄ Ba ₉	M ₄ Ba ₇
Traitement	M ₄ (GMS) (Témoin)	M ₄ +0.5 μM (BAP)	M ₄ + 2.5μM (BAP)	M ₄ + 5μM (BAP)

*Tableau 7 : Traitements induisant le bourgeonnement axillaire
Extrémités apicales provenant de plantules âgées de 16 semaines*

L'organisation des sub-cultures et les résultats de l'essai d'enracinement sont présentés dans l'annexe 7.

Les manipulations effectuées durant le repiquage sont identiques à celles décrites au point 7-1 avec les mêmes conditions de sélections des rameaux axillaires.

Le M₄Ba₇ constitue l'unique milieu d'enracinement.

A la fin de cette expérience, nous faisons chuter la température comme pour les plantules âgées de 8 semaines.

L'information récoltée est traitée de manière identique à ce qui a été exposé pour les plantules âgées de 8 semaines pour comparer les résultats.

8-Paramètres étudiés

- Le taux de multiplication (%),
 - Le taux de vitrification des rameaux axillaires produits (%),
 - La taille moyenne des rameaux axillaires produits (cm),
 - Le taux d'explant formant un cal (%),
 - Le taux d'enracinement pour chaque milieu de multiplication d'origine (%).
-

CHAPITRE 2 : EMBRYOGENESE SOMATIQUE

Les étapes d'initiation impliquée dans le processus de l'embryogenèse somatique comprennent une phase de désorganisation des cellules qui engendre une réaction à un signal. Ce dernier est de type environnemental ou chimique. Il peut être aussi un résultat combiné (ALEXANDRO et CONGER, 2002).

Cette réaction aboutit à une dédifférenciation et à une phase d'induction qui génère la détermination et l'orientation de certaines cellules en cellules embryogènes (HUANG, 2002).

Les essais d'embryogenèse somatique sont restés infructueux pour l'espèce *Actinidia* (CHAT, 2003).

Au contraire, des résultats probants sont obtenus sur le genre *Vitis* suggérant la formation de masses méristématiques de type pro-embryonnaire dans les cals (COBANOV, 1998). Nous avons tenté de confirmer ces résultats sur l'espèce *Actinidia chinensis* PL. physiologiquement proche de la vigne (*Vitis vinifera* L.)

L'étude a porté sur des lots de graines de la variété Hayward. Les graines sont extraites sur des fruits mûrs au mois de décembre durant la campagne 2006/2007 pour les deux provenances :

- Verger de la station expérimentale de Boufarik (Algérie)
- Verger de la station expérimentale de Jourdain (Toulouse, France)

1. Techniques utilisées

L'embryogenèse somatique qui fait l'objet de notre travail porte sur l'induction suivie de la maturation des embryons somatiques produits.

Deux types d'embryogenèses somatiques ont été étudiés :

- Essais d'induction d'embryogenèse somatique directe (ESD)
- Essais d'induction d'embryogenèse somatique indirecte (ESI)

Les essais d'ESD portent sur 2 explants (Tigelles et cotylédons) de plantules âgées de 25 jours et sur de jeunes feuilles de plantules âgées de 8 semaines.

Le deuxième essai de micropropagation entrepris dans ce chapitre concerne l'ESI. Les explants utilisés sont de jeunes feuilles. Ces dernières, proviennent de plantules d'âges différents (8 et 16 semaines) et d'origine différente (Boufarik et Toulouse).

2. Désinfection du matériel végétal

Les graines utilisées pour le prélèvement ultérieur des tigelles et des cotylédons pour l'ESD sont désinfectées. Elles sont déposées dans des boîtes de Pétri pour germer (même principe qu'au point 2 du matériel végétal).

Les graines utilisées pour le prélèvement ultérieur des jeunes feuilles de plantules âgées 8 semaines pour l'ESD et de 8 et 16 semaines pour l'ESI sont mise à germer dans des bocaux (même principe qu'au point 7-1 du bourgeonnement axillaire).

3- Embryogenèse somatique directe : ESD

3-1- Tigelles et cotylédons

Après 25 jours de germination à 25°C ±1°C, les tigelles et les cotylédons sont prélevés à partir de jeunes plantules âgées de 8 semaines.

Ils sont sectionnés en fragments de 5 mm de long. Les explants sont mis sur un milieu d'induction embryogénèse somatique M₅ (M₁ + 25 µM de 2.4-D) à raison de 4 explants par boîte de Pétri.

Deux durées d'exposition de 7 et 14 jours à une température de 25°C ±1°C sous une PP de 16 heures quotidiennement.

Nous avons utilisé 10 boîtes de Pétri par durée de traitement (Tableau 8).

Milieu	Durée
M ₅ : M ₁ +25 µM (2.4-D)	7 jours
M ₅ : M ₁ +25 µM (2.4-D)	14 jours

Tableau 8 : Durée de traitement induisant l'embryogenèse somatique directe (Cas des tigelles et cotylédons).

Un traitement de développement et de maturation des embryons somatiques éventuellement formés est ensuite appliqué à tous les explants. Un premier repiquage a lieu sur le milieu M₆ (M₁ + 750 mg glutamine) suivi d'un deuxième repiquage 6 semaines plus tard sur le milieu M₇ (M₁ + 5.37 µM NAA + 2.5 µM AG₃).

Les 2 cultures se font dans les mêmes conditions expérimentales que lors du traitement d'initiation (au point 3-1).

La glutamine présente dans le milieu M₆ est additionnée avant l'autoclavage.

La gibbérelline (AG₃) présente dans le milieu M₇ est ajoutée après autoclavage à l'aide d'une seringue ajustée d'un filtre dont les mailles ont un diamètre de 0.2 µm.

Un prélèvement d'explants pour l'étude histologique ainsi qu'une observation macroscopique (à l'œil nu) est effectuée avant chaque repiquage.

Une dernière observation macroscopique des explants restants est effectuée après 7 à 8 semaines de culture après repiquage sur le milieu M₇.

3-2- Feuilles

Après 8 semaines de culture à $25 \pm 1^\circ\text{C}$ sous une PP de 16 heures et une irradiance de 38 à $62 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{sec}$, des disques foliaires sont excisés à partir de jeunes feuilles les mieux développées.

Ils sont repiqués sur le milieu M_5 à raison de 4 explants par boîte de Pétri.

Les explants ont subi 2 traitements d'induction dont les durées respectives sont de 7 jours et de 14 jours. Dix répétitions ont été réalisées par traitement.

Les traitements de développement et de maturation des éventuels embryons somatiques sont identiques à ceux des explants des tigelles et des cotylédons.

Une observation macroscopique ainsi qu'un prélèvement d'explant afin de réaliser des coupes pour des observations microscopiques ont eu lieu avant chaque repiquage.

Le test se termine par une observation macroscopique des explants restants, sur le milieu M_7 après 4 ou 5 semaines de culture.

4- Embryogenèse somatique indirecte (ESI)

4-1- Plantules d'Actinidia : Station de Boufarik.

Sur des plants âgés de 8 semaines (groupe1) et 16 semaines (groupe 2), les jeunes feuilles les mieux développées sont excisées. Elles ont des dimensions sensiblement identiques.

Les explants ainsi obtenus sont mis en culture sur les milieux d'induction de callogenèse et d'embryogenèse M_8 ($M_1 + 4.5 \mu\text{M}$ (2,4-D) + $4.6 \mu\text{M}$ (kin) + 8 g/l d'Agar) et M_9 ayant la même composition à l'exception de l'agar qui est de 12g/l.

Nous avons utilisé 5 boîtes de Pétri par traitement soit 20 explants par traitement et par milieu.

Exposition	Obscurité	Photopériode de 16H Temp. $26 \pm 1^\circ\text{C}$
20 explants/milieu	M_8	M_8
	M_9	M_9

Tableau 9: Traitement induisant la callogenèse et l'embryogenèse somatique indirecte Jeunes feuilles de plantules issues de graines de Hayward (Origine verger de la station de Boufarik)

L'annexe 8 regroupe les différentes sub-cultures effectuées lors des traitements d'induction de la callogenèse et de l'embryogenèse somatique pour le premier groupe de feuilles.

Les différentes données récoltées sont mentionnées après chaque repiquage.

Le groupe 2 des jeunes feuilles est similaire au groupe 1. Néanmoins, il comporte un nombre réduit de sub-cultures avec l'absence du traitement à l'obscurité (Annexe 9).

Des traitements de développement et de maturation des embryons somatiques éventuellement formés sont appliqués aux cals de feuilles du premier et deuxième groupe (Annexes 10 et 11).

Les milieux M₁₂ et M₁₃ contiennent de l'ABA qui est additionné au milieu de culture après autoclavage à l'aide d'une micropipette (0.2 µm).

Les cals mis en culture sont au nombre de 4 par boîte de Pétri.

Le taux de croissance relatif moyen (RGR) est calculé sur la base du poids frais des cals pour chaque milieu d'induction.

$$\text{RGR} = (\text{Ln}(\text{Fwf}) - \text{Ln}(\text{Fwi})) / t.$$

Avec Fwf = poids frais final (mg)

Fwi = poids frais initial (mg)

t = durée de culture (mn)

Une observation macroscopique et une étude histologique des cals issus des milieux d'induction, de développement et de maturation complète notre étude.

4-2- Plantules d'Actinidia : Station de Jourdain (Toulouse)

Pour indisponibilité du matériel végétal, des essais ont porté seulement sur des plantules âgées de 8 semaines.

Les deux jeunes feuilles les plus développées sont excisées à partir de plantules. La mise en culture se fait sur deux milieux d'induction de callogenèse et d'embryogenèse somatique M₈ et M₉.

Exposition	Photopériode de 16H Temp. 26°C ± 1°C
20 explants/milieu	M ₈
	M ₉

Tableau 10: Traitement induisant la callogenèse et embryogenèse somatique indirecte Jeunes feuilles de plantules issues de graines de la variété Hayward Origine : station de Jourdain (Toulouse).

Trois sub-cultures de cal sont réalisées pour les traitements d'induction. Les différentes données sont mentionnées dans l'annexe 12. Le nombre de cals par boîte de Pétri se limite à 4.

Les étapes de traitements, de développement et de maturation des embryons somatiques éventuellement formés sont enregistrées. Une dernière observation macroscopique des cals est réalisée à la fin de l'expérience (Annexe 13).

Les observations macro et microscopiques des cals ainsi que le calcul du RGR moyen sur la base du poids frais des cals constitue les résultats des traitements d'induction.

Notons que le traitement à l'obscurité n'a concerné que les plantules du 1^{er} groupe en provenance du verger de la station expérimentale de Boufarik (Algérie).

5- Techniques histologiques

Dans le but d'observer les différents types de tissus qui existent dans les organes étudiés, des coupes transversales ont été réalisées. Ces dernières ont été observées au microscope optique de marque Zeiss.

Une seule technique de préparation de coupes histologiques a été utilisée (JANSEN, 1962).

Une première étape consiste à fixer les tissus végétaux dans une solution FAA qui se compose de :

- Ethanol 70 % (90 ml),
- Acide acétique glacial (5 ml),
- Formaldéhyde (5 ml).

Après 24 heures les échantillons sont rincés 2 fois dans l'éthanol 70 % pendant 30 mn.

Ils peuvent ensuite être conservés à $4 \pm 1^\circ\text{C}$ ou entamer l'étape de déshydratation par le transfert dans une série de bains. Ces derniers contiennent au préalable de l'éthanol en concentrations croissantes qui est graduellement remplacé par du buthanol.

Les échantillons sont introduits dans des creusets en porcelaine où se trouve de la paraffine liquide pour enrobage.

Le buthanol permet une meilleure pénétration de la paraffine au sein des tissus testés.

L'infiltration de la paraffine dans les échantillons se fait progressivement d'abord dans une étuve réglée préalablement à $37 \pm 1^\circ\text{C}$ puis à $60 \pm 1^\circ\text{C}$.

Une fois la paraffine refroidie, les blocs de paraffine ainsi formés, contiennent les échantillons. Ils peuvent être découpés en petits cubes qui seront fixés sur des blocs de bois.

Des coupes sériées de $5 \mu\text{m}$ d'épaisseur sont réalisées à l'aide d'un microtome.

Les rubans formés sont étalés sur des lames porte-objet qui sont enduit au préalable de la solution de Haupt (Annexe 5). Cette dernière favorise une bonne adhésion des coupes. Quelques gouttes d'eau formolée (4 %) sont ajoutées sur la lame pour permettre un bon étalement de la coupe.

Les lames sont séchées sur une plaque chauffante durant 5 mn.

Les coupes sont colorées à l'hématoxyline de Regard. Ce colorant naturel extrait du bois de *Caesalpinia campechiana* permet de mettre en évidence respectivement la chromatine colorée en marron-rougeâtre et les parois cellulaires qui deviennent bleu-violet.

La dernière étape consiste à mettre une goutte de baume du Canada (résine naturelle extraite des arbres de conifères : *Abies balsamea*). Elle est étalée sur les objets colorés qui sont ensuite recouvert d'une lamelle. Après quelques jours de séchage dans l'étuve à $37 \pm 1^\circ\text{C}$, les lames sont prêtes à être observées au microscope optique.

La conservation des lames se fait dans une boîte de collection.

CHAPITRE 3 : CULTURE DE MERISTEME

La culture de méristèmes constitue une des applications importante notamment pour l'éradication de nombreuses maladies (viroses, mycoses, mycoplasmoses et bactérioses).

Les méristèmes représentent de petits massifs de cellules indifférenciées (0,1 mm) qui conservent la capacité de se diviser activement. Ces zones méristématiques jouent un rôle capital dans le développement végétal puisqu'elles édifient tous les organes végétaux.

Les cellules méristématiques sont localisées aux niveaux des apex du végétal.

Ce sont les travaux de WHITE, (1934) sur la répartition des virus dans les racines de tomate (*Lycopersicum esculentum* L.) qui ont ouvert la voie de l'utilisation de la culture de méristème pour l'assainissement des souches végétales. Cet auteur a observé que dans les racines isolées provenant de plantes infectées, le nombre de particules virales décroît régulièrement vers les parties apicales.

Par ailleurs, LINASSET et CORNUET, (1949) ont observé le même phénomène dans les tiges. Le dôme apical était la seule partie de la plante indemne de virus.

Ces résultats ont conduit MOREL, (1960) à utiliser la culture in-vitro de méristèmes pour obtenir des plantes indemnes de virus.

1- Prélèvement des méristèmes

Sur des plantules d'*Actinidia chinensis* PL. âgées de 1 an, cultivées sous serre (ITAF de Boufarik), de jeunes pousses de 20 à 25 cm sont prélevées.

Les variétés étudiées sont :

V ₁ F: Hayward	}	Variétés femelles
V ₂ F: Monty		
V ₃ M: Tomuri	}	Variétés mâles
V ₄ M: Matua		

Après la suppression des jeunes feuilles, les boutures herbacées portant chacune un bourgeon sont fragmentées en segments de 10 à 15 mm.

Sous hotte à flux laminaire et sous une loupe binoculaire, l'explant de la tige herbacée est désinfecté à l'hypochlorite de sodium (6 %) pendant 15 mn suivi par un rinçage abondant à l'eau distillée stérile.

Le bourgeon est débarrassé des primordiaux en les écartant vers l'extérieur à l'aide d'un scalpel.

Le méristème se présente sous forme d'un dôme brillant. Il est sectionné avec 1 ou 2 ébauches foliaires soit transversalement en une fois soit en biseau en deux fois (Figure 9).

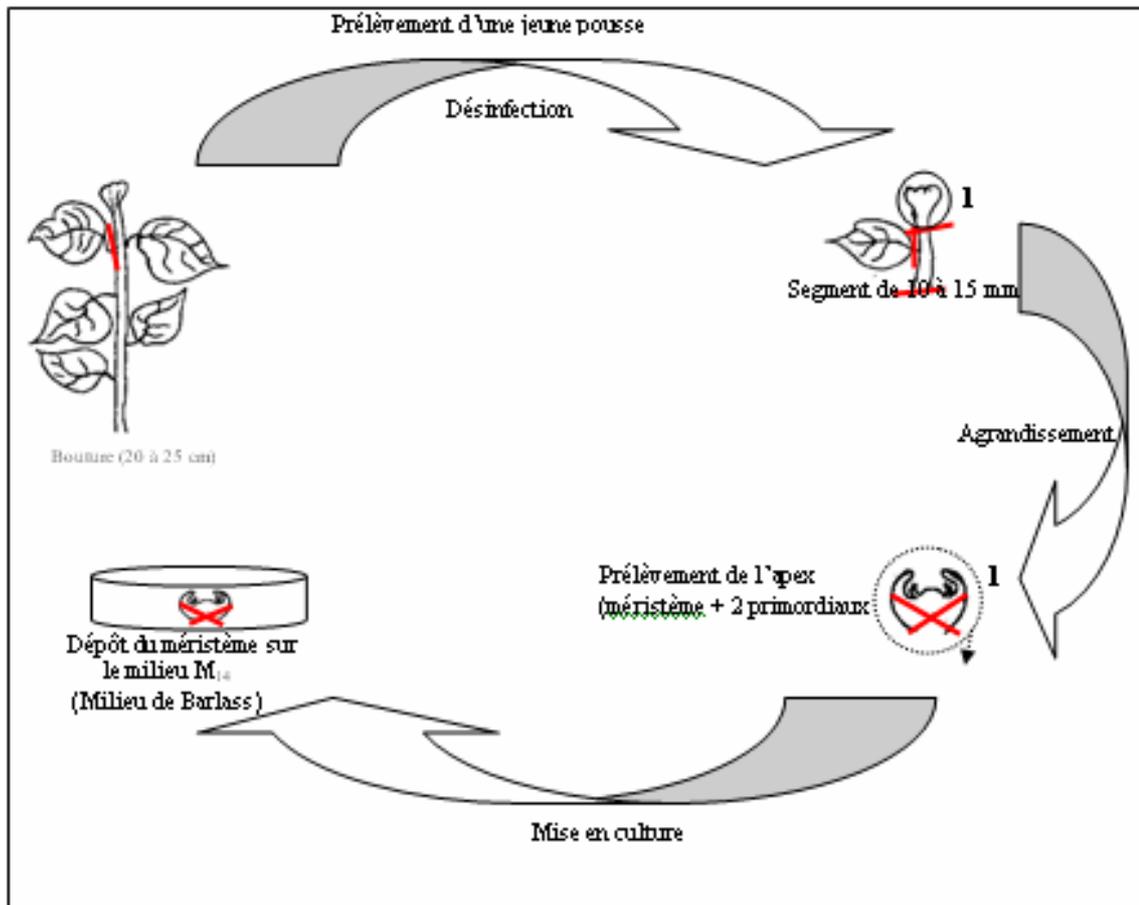


Figure 9 : Mode de prélèvement du méristème

Le dôme apical mesure 0,4 à 0,6 mm. Les explants au nombre de 50 par variété sont transférés rapidement dans des boîtes de Pétri qui contiennent le milieu de Barlass M₁₄ (Annexe 5). Nous avons installé 2 méristèmes par boîte de Pétri. Ainsi, le nombre de boîtes de Pétri est de 25 par variété soit au total 100 boîtes pour les 4 variétés étudiées.

Le milieu de Barlass (M₁₄) permet le déclenchement et la stimulation du bourgeonnement (BARLASS et al., 1982).

2- Evolution du méristème

Le développement des explants est suivi durant toute la période de l'expérimentation. Il a duré environ de 5 mois.

Trois phases se succèdent lors du développement des cellules méristématiques :

2-1- Phase de bourgeonnement

Cette étape permet la prolifération et la multiplication cellulaire dans un milieu de MURASHIGE et SKOOG (1962) (M₁).

Le développement du méristème des variétés étudiées est apprécié en prenant en considération leur diamètre d'évolution (mm) par l'utilisation d'un papier millimètre.

2-2- Phase de multiplication et d'allongement

Durant cette phase, les cals mamelonnés sont fragmentés et transférés dans des tubes de culture contenant le milieu de MURASHIGE et SKOOG (1962) dilué deux fois ($M_1 / 2$).

Cette étape permet aux vitro-plants de poursuivre leur croissance. Le nombre de tubes de culture est de 50 par variété.

2-3- Phase d'enracinement.

Des pousses feuillées avec tiges de 30 à 40 mm de longueur sont repiquées dans un milieu contenant une auxine pour favoriser la rhizogenèse. Deux méthodes d'enracinement ont été testées sur deux lots de 30 pousses/variété.

- La première méthode : nous avons utilisé un milieu de culture (MS/2 + 0.1mg/l d'ANA) où induction et allongement racinaire se font en une seule étape.
- Dans la deuxième méthode, nous avons effectué la technique de trempage rapide (10 secondes) dans une solution AIB (50 mg/l). Cette solution hormonale provoque l'induction racinaire. Elle est suivie d'un transfert sur un milieu MS/2 pour l'allongement racinaire.

Les paramètres suivis sont :

- le nombre moyen des racines formées par tige.
- la longueur moyenne des racines formées par tige.

3- Conditions de culture

Les boîtes de Pétri contenant les méristèmes sont transférées dans la chambre de culture où toutes les conditions nécessaires au développement et à la croissance sont réunies, à savoir :

- Une PP d'éclairage blanc de 16 heures et 8 heures d'obscurité,
- Une thermopériode de $22 \pm 1^\circ\text{C}$ pendant le jour et $24 \pm 1^\circ\text{C}$ pendant la nuit.
- Un examen visuel journalier est indispensable pour vérifier la présence de contaminations fongiques ou bactériennes. Les boîtes de Pétri infectées sont écartées.

Les conditions de l'expérimentation étant contrôlées, le dispositif expérimental retenu est un dispositif en randomisation totale.

4- Acclimatation des plantules

Les plantules obtenues (pousses feuillées enracinées) ont été acclimatées dans une serre en verre au niveau de la station expérimentale de la faculté agro-vétérinaire et biologie de Blida.

La température et l'humidité sont contrôlées ($25 \pm 1^\circ\text{C}$ et 80 % d'hygrométrie).

Nous avons utilisé des pots contenant un substrat (1/3 Tourbe et 2/3 sable). Le pot a une capacité de 0.5 litre.

RESULTATS ET DISCUSSION

Avant d'entamer ce dernier chapitre, nous nous devons d'apporter certaines explications qui sont nécessaires. Elles mettent en évidence la ligne de conduite de nos essais expérimentaux expliquant ainsi, la suite de la rédaction de cette thèse.

La désinfection reste une contrainte majeure pour le matériel végétal prélevé in-situ.

En effet, la capacité des différents explants destinés à la mise en culture (caractéristique chez l'espèce étudiée), rend difficile l'élimination des micro-organismes.

FRANCLET, (1981) mentionne que les principales difficultés rencontrées dans la multiplication in-vitro des ligneux sont dues :

- Aux fortes contaminations des explants et à la difficulté d'obtenir une culture axénique,
- A la libération de substances phénoliques dans le milieu de culture,
- Au statut de la plante mère (son génotype et son état nutritionnel),
- Au statut physiologique de l'explant.

Sammarcelli, (1988) in Xiao, (1991) considère que l'un des problèmes majeurs rencontré lors de la micropropagation de l'Actinidia est le matériel végétal prélevé directement du verger.

Quant aux graines, aucune infection n'a été observée lors de la germination, indiquant ainsi l'efficacité du mode de désinfection adopté. Exception faite pour le lot de graines provenant de la station de Jourdain (Toulouse, France) où un voile mycélien a freiné la germination. Ce problème est parvenu lors des essais de bourgeonnement axillaire où les graines étaient conservées dans les conditions inadéquates, au laboratoire. Les graines étaient exposées à la température du laboratoire à $25^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ et emballées dans du plastique.

CHAPITRE 1 : ORGANOGENESE

L'objectif visé est l'étude de l'influence de l'origine du matériel végétal sur la réponse à l'organogenèse de trois types d'explants (pétioles, disques foliaires et entre-nœuds).

Malheureusement, il n'a pas été possible d'effectuer cette comparaison et ce pour les raisons suivantes :

- vitro-semis

Vu l'aspect des vitro-semis, caractérisés par le rapprochement des entre-nœuds (environ 3 mm), nous n'avons alors utilisé que les fragments de pétioles et les disques foliaires.

- **Matériel végétal prélevé in-situ**

La difficulté rencontrée se situe au moment de la désinfection des explants du matériel végétal prélevé directement du verger, dont la plantation a été effectuée en 1985.

En dépit d'un certain taux de contamination pour les fragments de pétioles et d'entre-nœuds, il a été possible de poursuivre l'expérimentation avec ces deux types d'explants.

Les jeunes feuilles, quant à elles, et malgré les précautions prises au moment de la désinfection, un taux de contamination très élevé a été enregistré.

Pour les quelques explants restés sains, nous avons constaté un brunissement des disques foliaires, signe d'une oxydation. Ceci nous a contraint à n'utiliser que les fragments d'entre-nœuds et de pétioles.

1- CALLOGENESE

1-1- Matériel végétal issu de vitro-semis

- Effet des milieux et types d'explants sur le taux de la callogenèse

Le taux de germination des graines utilisées est de l'ordre de 90 %.

Selon BRENCKMANN et MILLET, (1998), la germination est sous le contrôle d'un équilibre entre deux hormones à action antagoniste, l'acide abscissique et l'acide gibbérellique. Ces deux hormones sont sous l'influence de facteurs de levée de dormance tel que le froid.

Cette constatation est confirmée pour l'Actinidia et pour certaines espèces ligneuses tel que le merisier (*Prunus avium*) où la germination ne peut être déclenchée que si les graines ou les noyaux ont subi une certaine quantité de froid.

LANG et al., (1959), signalent que l'acide gibbérellique augmente le pourcentage des graines germées et la vitesse de germination.

L'analyse de la variance indique que les deux facteurs (type d'explants et milieux de culture) exercent un effet très hautement significatif sur le pourcentage de la callogénèse (Annexe 14).

Cette constatation s'observe pour les deux types d'explants utilisés, en l'occurrence les fragments de pétioles et les disques foliaires sur les différents milieux utilisés (Figure 10).

L'annexe 15 mentionne que pour le premier facteur (types d'explants), les disques foliaires présentent la meilleure aptitude à la callogénèse avec une moyenne de 32.08% ±1.52 pour tous les milieux.

Une moyenne de 20,32 % ±0.77 est enregistrée pour les pétioles.

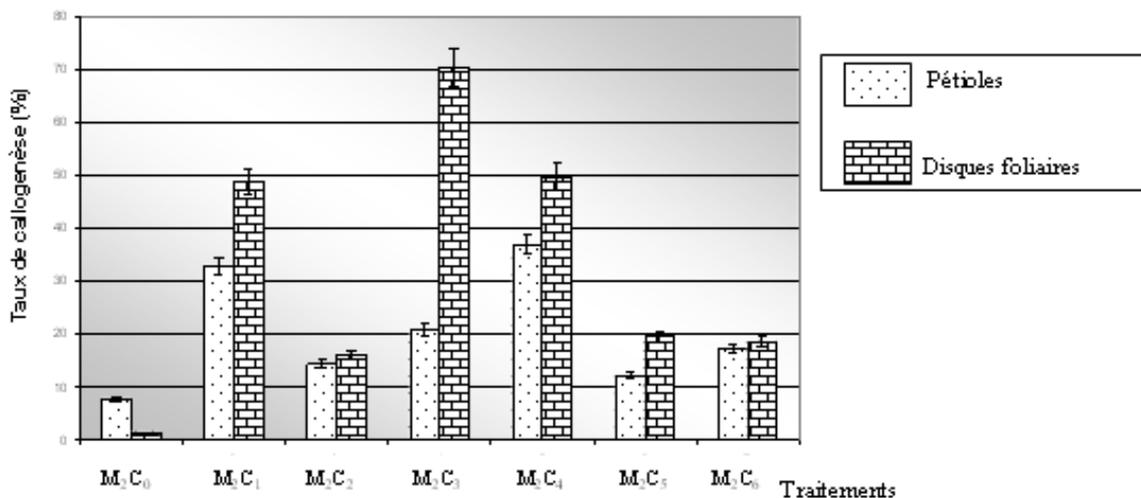


Figure 10 : Effet des milieux et types d'explants sur le taux de la callogénèse.

Le deuxième facteur indique que le milieu M₂C₃ (1 mg/l de 2,4D + 1 mg/l de BAP) a un pouvoir callogène important, avec un taux de 45,58% ±2.00 pour les deux explants. Il est suivi par les milieux M₂C₄ (1 mg/l d'AIA) + 1 mg/l de Kin) et M₂C₁ (1 mg/l de 2,4D) avec respectivement 43,29% ±1.69 et 40,88% ±0.65.

Le milieu M₂C₀ (témoin sans hormone) présente le plus faible pouvoir callogène avec un taux moyen enregistré de 4,63%±0.02 pour les disques foliaires et les pétioles (Annexe 15).

Les milieux M₂C₄ (1 mg/l d'AIA) + 1 mg/l de Kin) et M₂C₁ (1 mg/l de 2,4D) ont montré une aptitude à la callogénèse importante pour les fragments de pétioles.

En effet, le milieu M₂C₄ présente un taux de callogène de 36,93% ±0.71. Il est suivi par le milieu M₂C₁ dont le taux est de 32,88 % ±0.40. Notons que le milieu M₂C₀ présente le plus faible taux avec une valeur de 7,85% ±0.04 (Annexe 15).

La réponse des disques foliaires à la callogénèse est plus importante sur le milieu M₂C₃ avec un taux de 70,30% ±3.25. Les milieux M₂C₁ et M₂C₄ induisent une réponse moyenne avec un taux respectivement de 48,89% ±1.05 et 49,65% ±2.77.

Le milieu témoin (M₂C₀) présente le plus faible pouvoir callogène avec un taux de l'ordre de 1,38% ±0.01 (Annexe 15).

1-1-1- Effet des milieux et types d'explants sur le poids frais des cals

Les résultats de l'analyse de la variance sont mentionnés sur la figure 11 et l'annexe 16.

Nous constatons un effet très hautement significatif des deux facteurs sur le poids frais des cals.

Le poids frais des cals issus de disque foliaires est supérieur à celui des fragments de pétioles avec $199.99 \text{ mg} \pm 4.84 \text{ mg}$ comparé à celui des fragments de pétioles qui est de $141.54 \text{ mg} \pm 4.84 \text{ mg}$ (Annexe 17).

Le milieu M_2C_1 permet un développement des cals plus important avec une moyenne de $287.25 \text{ mg} \pm 7.93 \text{ mg}$. Les milieux M_2C_3 et M_2C_4 donnent des résultats appréciables, avec des moyennes de poids frais respectives de $256.00 \text{ mg} \pm 4.65 \text{ mg}$ et $263.00 \text{ mg} \pm 4.62 \text{ mg}$ (Annexe 17).

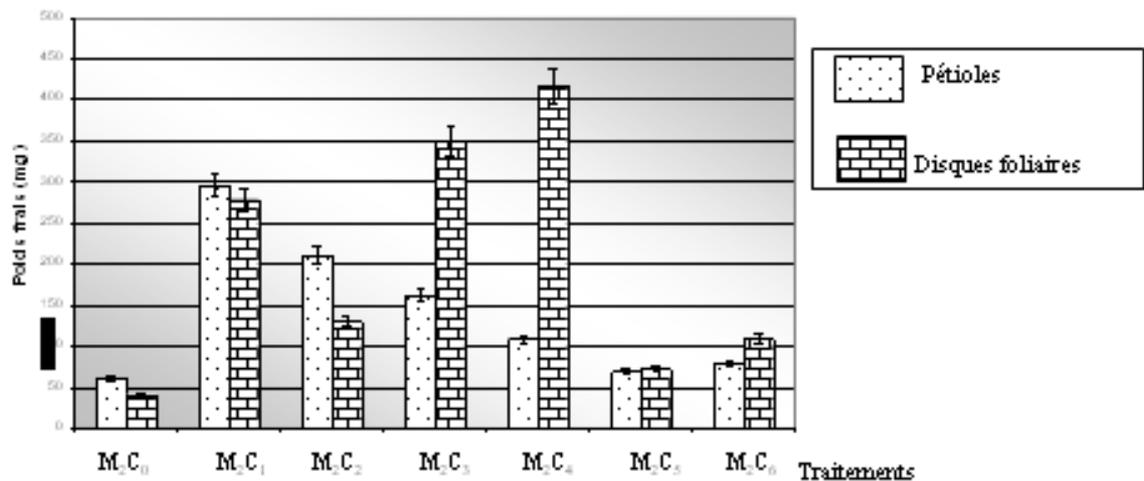


Figure 11 : Effet des milieux et types d'explants sur le poids frais des cals

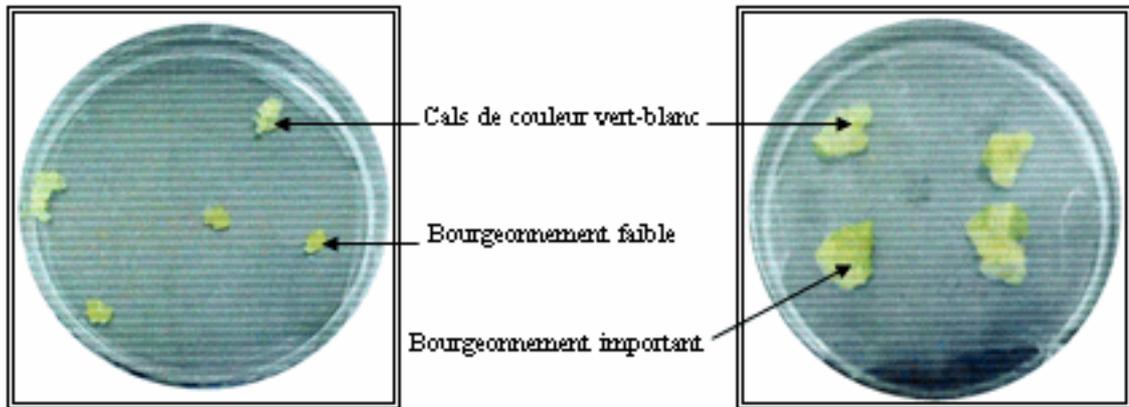
Nous observons un effet positif du milieu M_2C_1 sur le poids frais des cals issus de fragments de pétioles. Le poids moyen des cals est important, il est $296.50 \text{ mg} \pm 13.44 \text{ mg}$. Le milieu M_2C_2 présente des résultats satisfaisants avec des cals dont le poids frais est de $211.50 \text{ mg} \pm 6.3 \text{ mg}$. Dans le milieu M_2C_0 , les cals présentent un poids frais moyen faible de $61.30 \text{ mg} \pm 1.13 \text{ mg}$ (Annexe 17).

Les milieux M_2C_4 et M_2C_3 permettent un développement de cals issus de disques foliaires très important avec respectivement un poids frais de $417.00 \text{ mg} \pm 5.66 \text{ mg}$ et $349.50 \text{ mg} \pm 4.95 \text{ mg}$.

Le milieu M_2C_0 donne les plus faibles résultats. En effet, le poids moyen frais des cals est de $40.95 \text{ mg} \pm 3.18 \text{ mg}$ (Annexe 17).

1-1-2- Aspect des cals

L'aspect des cals obtenus sur les différents milieux utilisés et pour les deux types d'explants (fragments de pétioles et disques foliaires) sont de couleur vert-blanc à beige. Ils sont de texture friable (Figures 12 et 13).



1-2- Matériel végétal prélevé in- situ

Le matériel végétal est prélevé sur des arbres en pleine activité physiologique durant la campagne 2005/2006 dans le verger de la station de Boufarik.

1-2-1- Effet des milieux et types d'explants sur le taux de la callogénèse

Les résultats illustrés dans la figure 14 et l'annexe 19 indiquent que les entre-nœuds présentent la meilleure aptitude à la callogénèse avec une moyenne de 37.52% ±2.31 alors qu'elle n'est que de 14.01% ±1.54 pour les explants de pétioles.

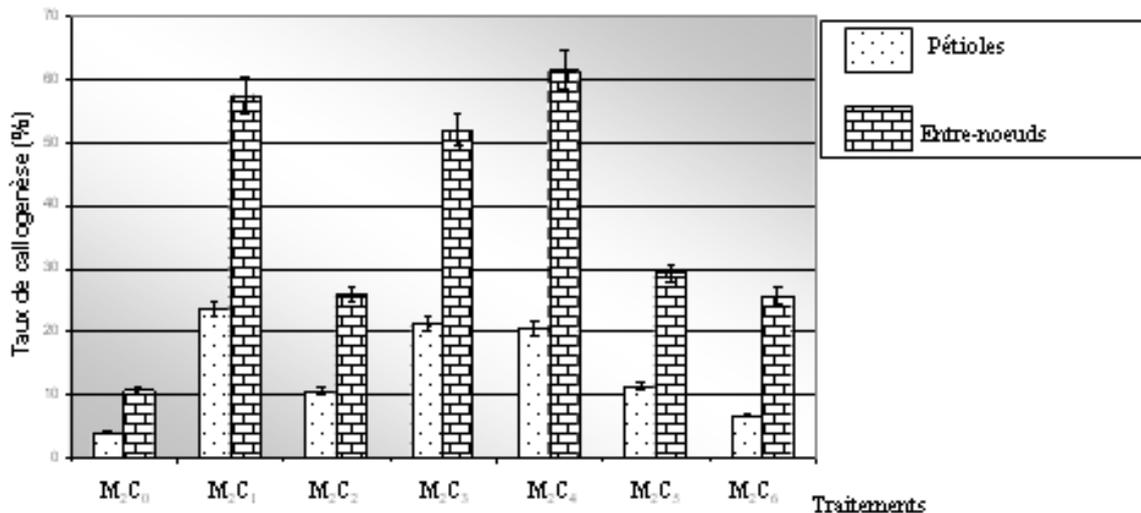


Figure 14 : Effet des milieux et types d'explants sur le taux de la callogénèse

L'analyse de la variance du facteur 1 (explants), facteur 2 (milieux) et inter-factorielle indique une action très hautement significative sur le taux de la callogénèse (Annexe 18).

Le plus important taux de la callogénèse est obtenu sur le milieu M₂C₄ suivi de M₂C₃ avec des moyennes respectives 40.98 % ±2.01 et 36.64 %±2.02.

Le milieu M₂C₀ présente un très faible pouvoir callogène. En effet, le taux moyen des cals est de 7.33 % ±1.37 (Annexe 19).

Les fragments de pétioles ont présenté le plus faible taux à la callogénèse. La plus faible valeur a été enregistrée avec le milieu témoin M₂C₀ 4 %±1.41).

Le milieu M₂C₁ a permis d'obtenir un taux de callogenèse de 23.6 %±3.68. Notons que ce milieu comprend une auxine le 2.4-D à raison de 1 mg/l.

Les milieux M₂C₃ et M₂C₄ permettent une callogenèse appréciable avec des valeurs respectives de 21.24 % ±1.76 et 20.48 % ±1.39 (Annexe 19). Ces milieux en plus de l'auxine contiennent une cytokinine. Il s'agit de la BAP pour le milieu M₂C₃ (1 mg/l), et de la kinétine pour le milieu M₂C₄ (1 mg/l).

Les milieux M₂C₁, M₂C₃ et M₂C₄ ont eu le plus fort pouvoir callogène sur les fragments d'entre-nœuds.

Le milieu M₂C₄ contenant la combinaison hormonale AIA/kin a donné le meilleur taux de callogenèse avec 61.46 % ±3.19 suivi par les milieux M₂C₁ et M₂C₃ avec respectivement 57.51 % ±2.14 et 52.03 % ±3.03. Le plus faible taux de callogenèse enregistré est celui des fragments d'entre-nœuds, sur le milieu M₂C₀ avec 10.66 % ±1.90 (Annexe 19).

1-2-2- Effet des milieux et types d'explants sur le poids frais des cals

L'annexe 21 indique que pour le facteur explants, les cals issus d'entre-nœuds, présentent un meilleur développement, avec une moyenne de poids frais de 548.21 mg ± 6.96 mg, tandis qu'il n'est que de 301.36 mg ± 4.12 mg pour les cals issus de pétioles.

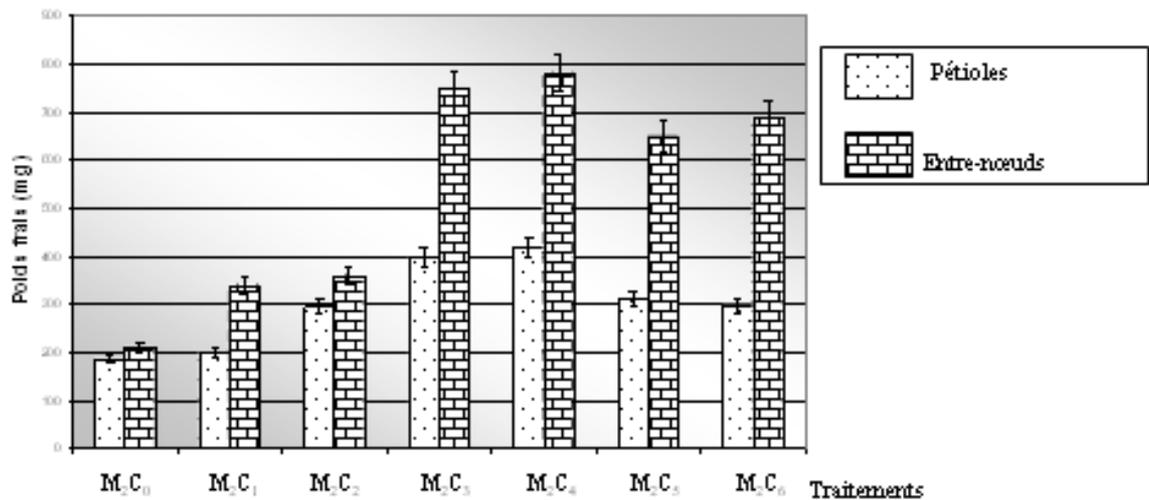


Figure 15 : Effet des milieux et types d'explants sur le poids frais des cals

L'analyse de la variance des deux facteurs et inter-factorielle indique que les explants et les milieux exercent une action très hautement significative sur le poids frais des cals (Annexe 20).

Nous constatons pour le facteur milieux, la concentration M₂C₄ permet un meilleur développement des cals avec une moyenne de 600.75 mg ± 3.68 mg. Le milieu témoin donne le plus faible développement avec une moyenne de 199.25 mg ± 4.24 mg (Annexe 21).

Le poids frais des cals issus de fragments de pétioles atteint un poids moyen de 420.00 mg ± 5.02 mg pour le milieu M₂C₄ comparé au témoin dont le poids est de 199.25 mg ± 4.24 mg (Annexe 21).

Les milieux M₂C₄ et M₂C₃ ont permis le meilleur développement des cals issus de fragments des entre-nœuds avec des poids frais moyens respectivement de 781.50 mg ± 4.35 mg et 748.50 mg ± 5.98 mg.

Les milieux M₂C₆ et M₂C₅ permettent également un développement des cals, issus de fragments des entre-nœuds, appréciable avec des poids frais moyens respectivement de 688.00 mg ± 8.47 mg et 649.00 mg ± 7.11 mg.

Le témoin enregistre un poids frais moyen de 211.50 mg ± 6.13 mg (Figure 15 et annexe 21).

1-2-3- Aspect des cals

Les deux types d'explants cultivés sur les différents milieux ont donné des cals de couleur vert-blanc à beige. La texture est friable.

Discussion

Les résultats mentionnés précédemment, montrent que quelque soit l'origine du matériel végétal testé (issu de vitro-semis ou prélevé in-situ en plein champ), l'aptitude à la callogenèse dépend du type d'explant mis en culture d'une part, et du milieu de culture testé d'autre part.

Parallèlement à cela, nous remarquons que quelque soit le type d'explant (pétioles, entre-nœuds ou disques foliaires), le meilleur pourcentage de callogenèse est obtenu avec les milieux M₂C₄ (M₂+ 1 mg/l d'AIA) + 1 mg/l de kin) et M₂C₁ (M₂+ 1 mg/l de 2.4-D). Notons que ces deux milieux contiennent une auxine (AIA ou 2.4-D).

Ces résultats rejoignent ceux de XIAO, (1991) qui confirme que 1mg/l de 2.4-D présente le meilleur pouvoir callogène pour les espèces ligneuses dont notamment l'Actinidia.

GAMBORD et al., (1976), signalent que la callogenèse est favorisée dans la plupart des cas par l'utilisation du 2.4-D. Ce résultat a été confirmé par LAFON et al., (1998).

D'après SAKA et al., (1997), quelque soit la concentration du milieu en 2.4-D, la réponse à la callogenèse est similaire.

CHAUSSAT et al., (1980) estiment que le milieu de base MS (témoin) sans hormone de croissance ne manifeste aucune réaction callogène.

La multiplication de la pomme de terre (*Solanum tuberosum*) par la culture de méristème en présence d'auxine (ANA) et de cytokinine (BAP) montre un taux de callogenèse de l'ordre de 70 %. Il est nul lorsque le milieu de culture en est dépourvu (CHOUKRI, 1998).

Ceci indique l'importance de l'utilisation des régulateurs de croissance dans la manifestation de la callogenèse.

LAFON et al., (1998) mentionnent que lorsque la cellule se différencie, la totalité du matériel génétique est potentiellement utilisable. Le programme génétique de la plante peut donc repartir dans le cas d'une néoformation.

Selon le même auteur, ce sont les régulateurs de croissance qui permettent d'orienter le programme vers la formation de cal, de bourgeons ou même la régénération de la plante entière.

La réponse à la callogenèse des différents types d'explants montre que ce sont les entre-nœuds qui présentent une meilleure aptitude à la callogenèse, par rapport aux pétioles.

Cette constatation a été observée sur le matériel végétal âgé de 20 ans, prélevé in-situ (Figures 16,17, 18 et 19).

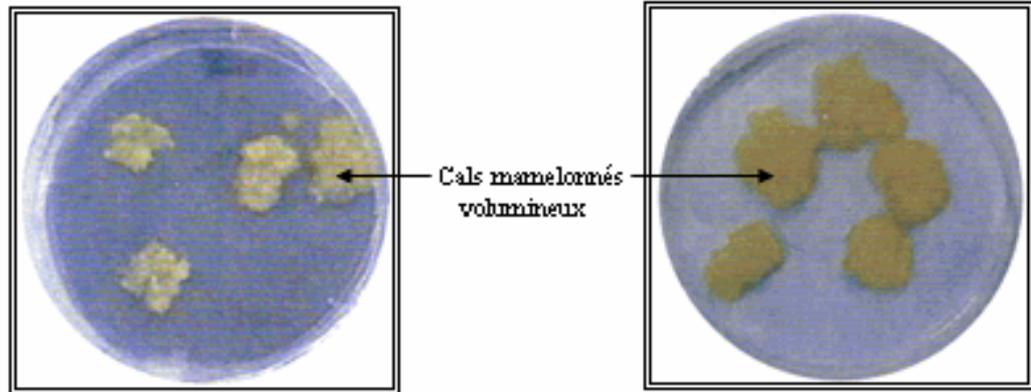


Figure 16 : Cals issus de fragments d'entre-nœuds (in- situ)

Figure 17 : Cals issus de fragments de pétioles (in- vitro)

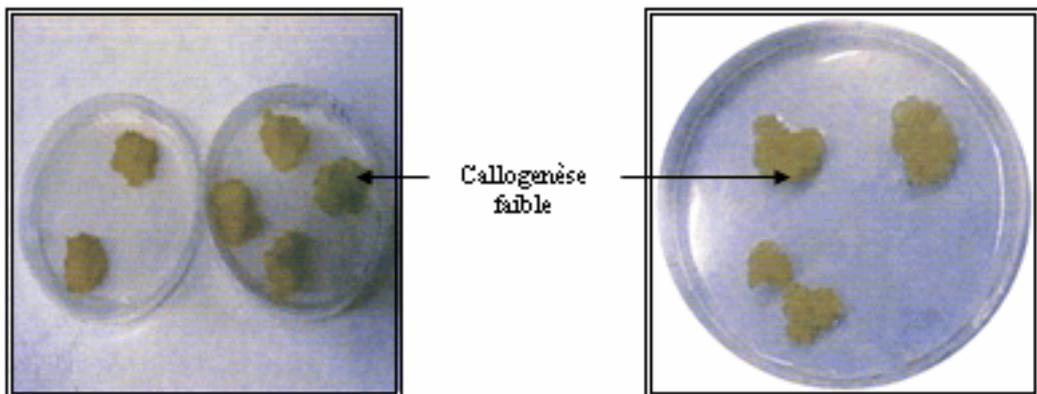


Figure 18 : Cals issus de fragments de disques foliaires (in- vitro)

Figure 19 : Cals issus de fragments de pétioles (in- situ)

Ces résultats confirment ceux obtenus par CHAT et al., 2004 sur les segments des entre-nœuds des variétés mâles et femelles d'Actinidia.

Quant au matériel végétal issu de vitro-semis, les disques foliaires manifestent une meilleure réponse à la callogenèse.

D'après MARGARA (1984), l'aptitude à la dédifférenciation et à l'organogenèse est très inégalement répartie selon les espèces et les tissus des différents organes.

Selon RAHN (1979) et BOXUS et al., (1995) toutes les portions de la plante n'ont pas la même réponse vis-à-vis d'un milieu donné.

DEMARLY et SIBI, (1996), affirment que lorsque l'explant est volumineux, il est moins sensible au milieu, car son réseau de signaux est plus fortement structuré. En outre, ils signalent que l'explant possède au moment de son prélèvement sa propre polarité, mais l'interaction avec le milieu de culture modifie cette polarisation.

La structure compacte et friable des cals est selon DUCREUX et al., (1986) l'aptitude de ces derniers à développer une plantule.

D'après ROSSIGNOL, (1988), la coloration verte des cals montre l'existence d'une activité photosynthétique, suggérant leur viabilité. La structure compacte nous renseigne sur l'aptitude des cals à former des tiges.

Cette constatation n'a pas pu être confirmée par les coupes histologiques et les observations cytologiques. En effet, nous avons pu observer seulement des amas confus de cellules sans aucune organisation.

2- CAULOGENESE

2-1- Matériel végétal issu de vitro semis

2-1-1- Effet des milieux et types d'explants sur le taux de pousses feuillées

Les résultats de l'action exercée par les deux facteurs étudiés sur le taux des pousses feuillées développées, sont regroupés dans l'annexe 22 de l'analyse de la variance.

Les facteurs explants et milieux ont un effet très hautement significatif sur le taux de pousses feuillées développées.

La figure 20 et l'annexe 23 reproduisent les résultats obtenus par les fragments de pétioles et les disques foliaires en fonction des différents traitements testés.

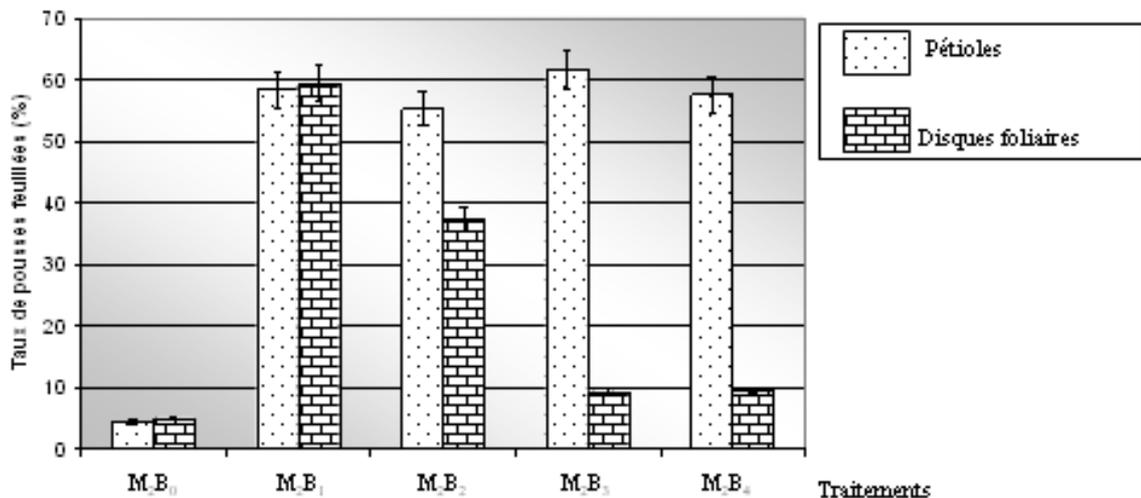


Figure 20 : Effet des milieux et types d'explants sur le taux des pousses feuillées

Les disques foliaires ont donné une meilleure néoformation de bourgeons, avec un taux moyen de 58.24%±1.59. Il est suivi des fragments de pétioles avec une moyenne de 28.92%±1.59 (Annexe 23).

Quant au milieu, M₂B₁(0.5 mg/l d'AIA + 1 mg/l de BAP), il donne les meilleurs résultats avec une moyenne de 58.87 %±1.49 de pousses feuillées développées. Il est suivi du milieu M₂B₂(0.5 mg/l d'AIA + 2 mg/l de BAP)avec une moyenne de 46.33 %±2.56 (Annexe 23).

Une moyenne de l'ordre de $59.35\% \pm 0.92$ a été enregistrée pour les fragments de pétioles sur le milieu M_2B_1 . Le milieu M_2B_2 donne des résultats non négligeables ayant permis une néoformation moyenne de $37.4\% \pm 3.96$.

Les milieux M_2B_3 et M_2B_4 donnent les plus faibles résultats. En effet, pour le premier une moyenne de $9.35\% \pm 0.92$ de pousses feuillées est enregistrée, pour le second, elle est de l'ordre de $9.57\% \pm 0.60$ (Figure 20 et annexe 23).

Les types d'explants ayant développé des pousses feuillées à partir des disques foliaires sur les quatre milieux testés donnent des résultats probants. Le milieu M_2B_3 enregistre un développement de pousses très important avec une moyenne de $61.63\% \pm$ suivi de M_2B_1 et M_2B_2 avec respectivement $58.40\% \pm 2.40$ et $55.25\% \pm 1.99$ (Annexe 23).

2-1-2- Effet des milieux et types d'explants sur le poids frais des cals

Le type d'explant, disques foliaires ou pétioles, n'exerce aucune action sur le poids frais des cals (Figure 21 et annexe 24).

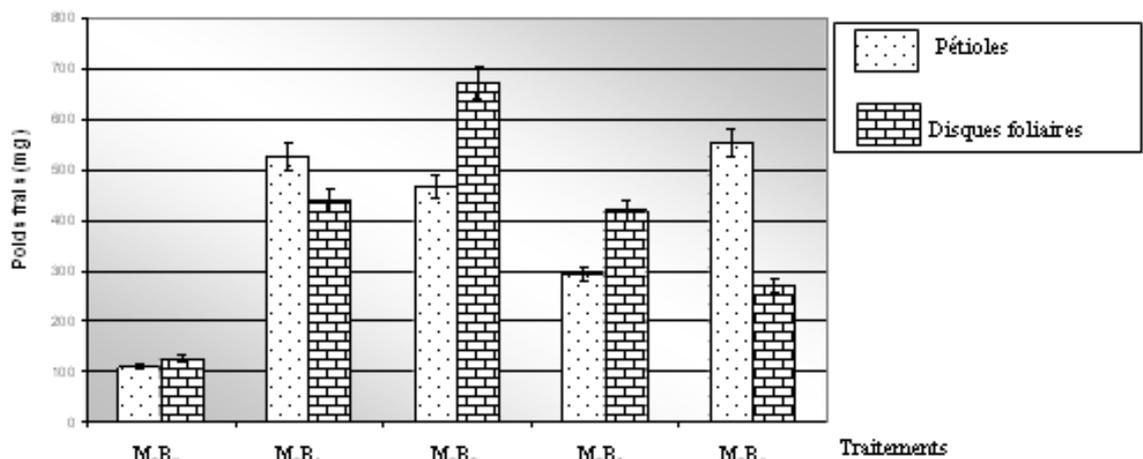


Figure 21 : Effet des milieux et types d'explants sur le poids frais des cals

Le facteur 2 (milieux) exerce une influence très hautement significative sur le poids frais des cals. En effet, selon le milieu utilisé, en combinant les concentrations hormonales, le poids frais des cals varie également (Annexe 24).

Il ressort clairement de la figure 21, que les deux types d'explants n'exercent aucune action sur le poids frais des cals. Tantôt ce sont les pétioles qui permettent un poids frais des cals important (cas des milieux M_2B_1 et M_2B_4) tantôt ce sont les disques foliaires qui enregistrent un poids frais plus important (milieux M_2B_2 et M_2B_3).

Le milieu M_2B_4 ($M_2 + 0.5$ mg/l d'AIA + 2 mg/l de kin) a permis l'obtention des cals dont le poids frais moyen est plus important pour les fragments de pétioles. Il est $554.50 \text{ mg} \pm 11.09$ mg. Le milieu M_2B_1 ($M_2 + 0.5$ mg/l d'AIA + 1 mg/l de BAP) donne des résultats appréciables avec un poids frais moyen de $526.5 \text{ mg} \pm 10.53$ mg. Les cals obtenus sur milieu M_2B_3 ($M_2 + 0.5$ mg/l d'AIA) + 1 mg/l de kin) (Annexe 25), montrent des poids frais moyens faibles de $293.00 \text{ mg} \pm 5.86$ mg.

Quant aux disques foliaires, le milieu M₂B₂ a enregistré un développement de cals de 673.00 mg ± 5.66 mg en comparaison avec le milieu M₂B₄ où le poids frais des cals est faible. Ce dernier est de 269.00 mg ± 4.24 mg (Annexe 25).

2-1-3- Aspect des cals

Les deux types d'explants repiqués sur les 4 milieux testés montrent des cals dont la couleur est beige avec une texture friable.

2-2- Matériel végétal prélevé in-situ

2-2-1- Effet des milieux et types d'explants sur le taux de pousses feuillées

Les résultats de l'action des facteurs, milieux de culture et explants, sur le pourcentage de pousses feuillées sont illustrés par la figure 22 et les annexes 26 et 27.

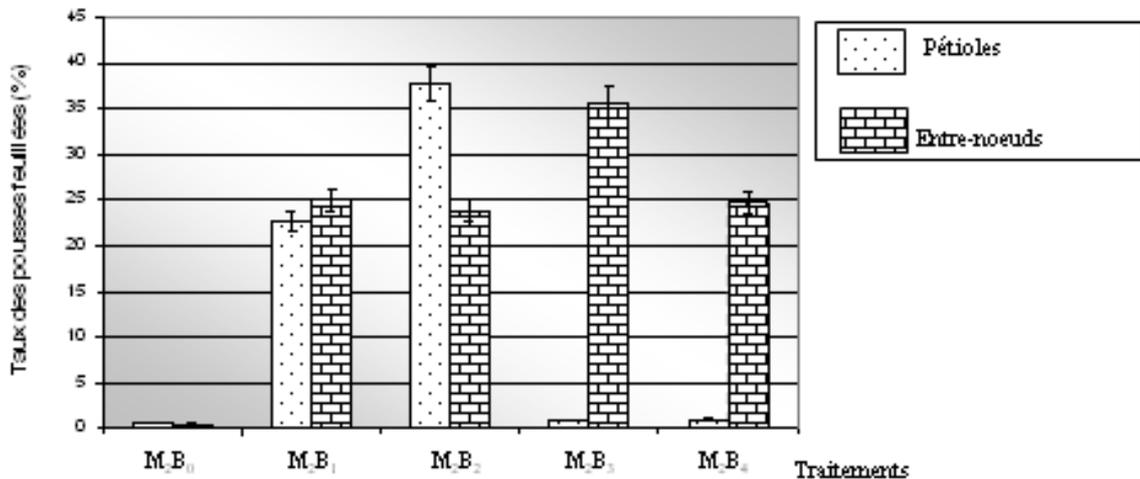


Figure 22 : Effet des milieux et types d'explants sur le taux de pousses feuillées.

Nous remarquons un effet très hautement significatif des deux facteurs sur le taux des pousses feuillées formées (Figure 22 et annexe 26).

Les résultats enregistrés dans la figure 22 et l'annexe 27 montrent que les explants des entre-nœuds sont plus aptes à la néoformation des jeunes pousses. Ils présentent une moyenne de 27.32 %±1.23 comparés aux explants de pétioles qui ne montrent que 15.60 %±1.97 de pousses feuillées développées.

Il s'avère que le milieu M₂B₂ (0.5 mg/l d'AIA et 2 mg/l de BAP) permet une meilleure néoformation de bourgeons avec une moyenne de 30.83 %± 2.03 suivi du milieu M₂B₁ avec 23.80%±2.20 de bourgeons néoformés.

La plus faible moyenne est observée sur le milieu M₂B₄ avec 12.93 %±0.87 de bourgeons néoformés (Annexe 27).

L'effet du milieu sur le taux de pousses feuillées développées à partir de fragments de pétioles montre une forte néoformation de bourgeons sur le milieu M₂B₂.

En effet, le pourcentage de pousses feuillées est de 37.80 %±3.11 suivi du milieu M₂B₁ dont le taux est de 22.60 %±3.68 (Annexe 27).

Les milieux M₂B₃ et M₂B₄ donnent une néoformation de bourgeons négligeable à presque nulle qui varie de 0.95 %±0.01 à 1.05 %±0.02.

Les résultats enregistrés sur les fragments des entre-nœuds, montrent que le milieu M₂B₃ présente une néoformation de bourgeons plus importante avec une moyenne de pousses feuillées développées de 35.64 %±2.63

Les résultats obtenus se rapprochent pour les milieux M₂B₁, M₂B₂ et M₂B₄ avec respectivement 25 %±0.99, 23.85 %±1.36 et 24.80 %±0.28 de pousses feuillées développées (Annexe 27).

2-2-2 Effet des milieux et types d'explants sur le poids frais des cals

La figure 23 et l'annexe 28 regroupent les résultats obtenus. L'explant de type entre-nœud donne des cals ayant un poids frais important avec une moyenne de 935.50 mg± 18.75 mg tandis qu'il n'est que de 518.63 mg ± 10.37 mg pour l'explant de type pétiole (Annexe 29).

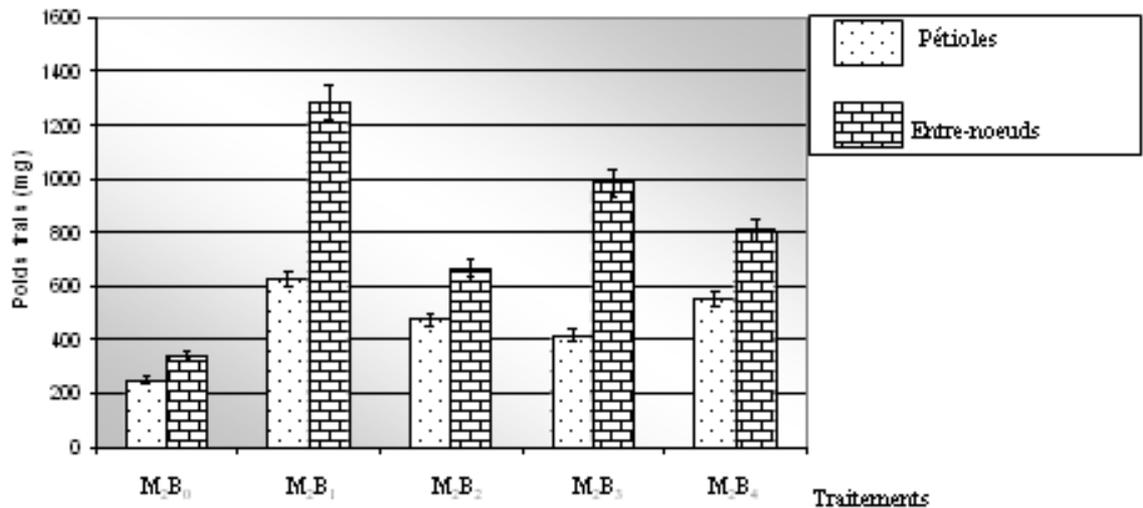


Figure 23 : Effet des différents milieux et types d'explant sur le poids frais des cals

Le milieu M₂B₁ enregistre le plus faible développement de cals avec une moyenne de poids frais de 954.75 mg ± 19.09 mg.

L'effet du milieu M₂B₁ sur le poids frais des cals issus de fragments de pétioles montre un développement de cals plus important, il est 626.50 mg ± 12.53 mg. Le plus faible développement est obtenu sur le milieu M₂B₃ où le poids frais des cals est de 416.00 mg ± 8.32mg.

Le poids frais des cals est plus important pour les fragments des entre-nœuds qui évoluent sur le milieu M₂B₁. La moyenne est de 1283.00 mg ± 28.28 mg. Les milieux M₂B₃ et M₂B₄ donnent des résultats satisfaisants permettant l'obtention de cals dont le poids frais moyen est respectivement de 984.50 mg ± 19.69 mg et de 809.00 mg ± 2.83 mg.

Le milieu M₂B₂ comparé aux trois autres milieux M₂B₁, M₂B₃ et M₂B₄ donne les plus faibles résultats avec des cals ayant un poids frais moyen de 665.50 mg ± 13.31 mg (Annexe 29).

2-2-3- Aspect des cals

Les cals développés sur les différents milieux utilisés, pour les deux types d'explants, montrent une couleur blanc-verdâtre avec une structure noduleuse et ferme.

Discussion

Les milieux M₂B₁ et M₂B₂ additionnés d'AIA et de BAP, sont ceux qui ont permis une meilleure néoformation des pousses feuillées (Figures 24 et 25).

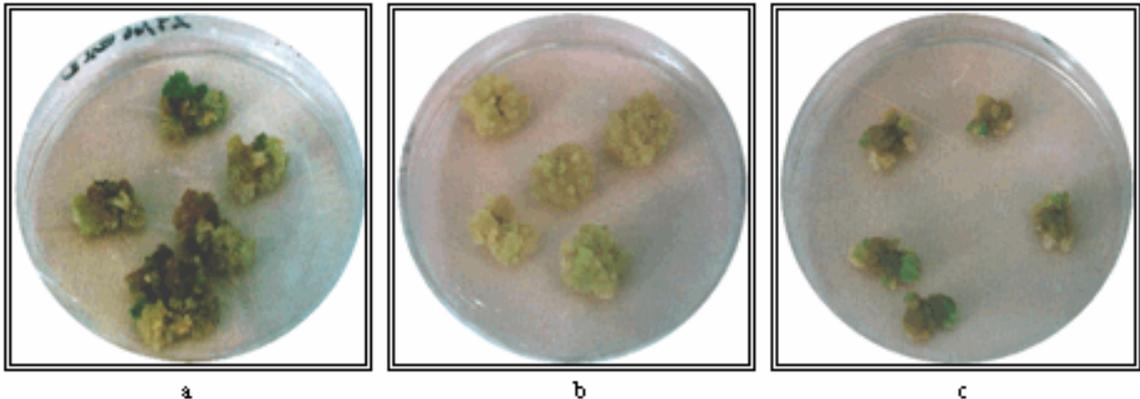


Figure 24 : Bourgeonnement des cals: a) à partir de fragments d'entre-nœuds (*in-situ*). b) à partir de pétioles (*in-situ*). c) à partir de disques foliaires (*vitro-semis*).

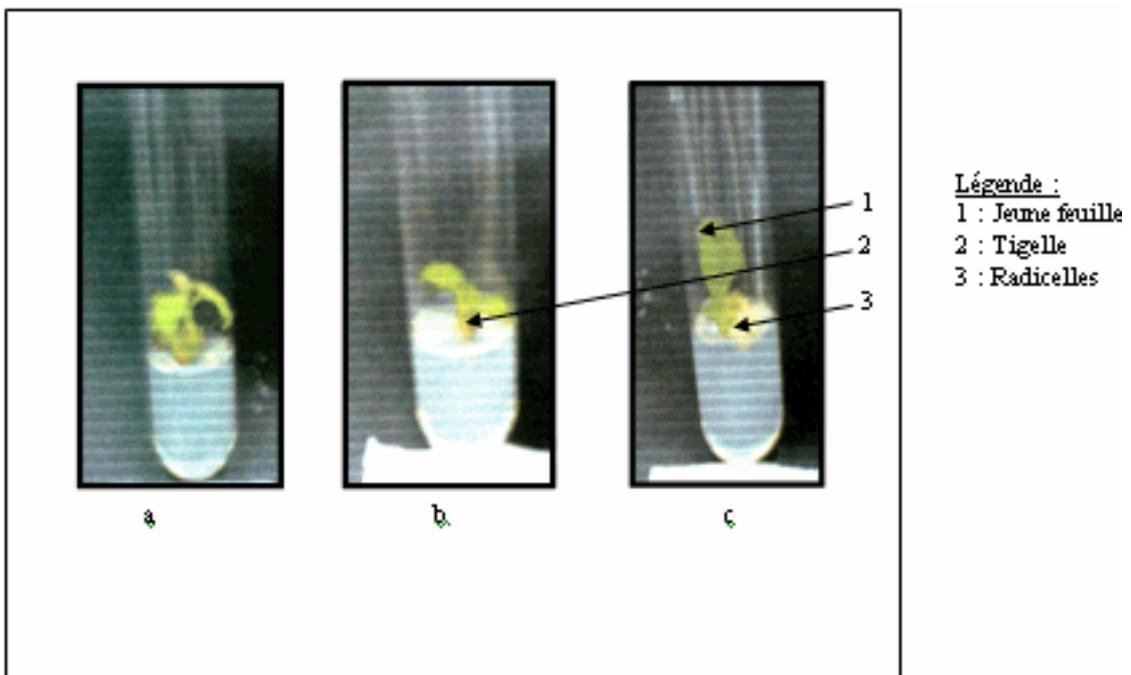


Figure 25 : Pousses feuillées issues : a) de fragments d'entre-nœuds (*in-situ*). b) de pétioles (*in-situ*). c) de disques foliaires (*in-vitro*).

BRHADDA et al., 2003 signalent que chez les espèces ligneuses, la présence de la BAP dans le milieu induit l'apparition de bourgeons néoformés ayant l'aspect de touffes.

Le déclenchement de la néoformation de bourgeons chez la plupart des espèces qui ne produisent pas spontanément de bourgeons adventifs résulte essentiellement de l'utilisation des auxines et des cytokinines.

Le choix du régulateur de croissance, la concentration utilisée et la séquence éventuellement employés sont importants (MARGARA, 1984).

RAHN, (1979), souligne que les différents segments de la plantule réagissent différemment selon le milieu testé. Les cultures de tissus obtenues à partir des organes jeunes donnent de meilleurs résultats pour une néoformation.

Padmanbhan et al., (1974) in Margara (1984) ont modifié l'orientation de l'organogenèse chez les jeunes feuilles de la tomate (*Lycopersicum esculentum*) en augmentant la concentration des régulateurs de croissance sans changer leur rapport. Ils ont constaté que la combinaison de l'AIA (2 mg/l) et la kinétine (4 mg/l) déclenche la néoformation des bourgeons.

Ainsi, il semble d'après nos résultats et la littérature étudiée, qu'il n'existe pas de règles concernant l'efficacité des différentes auxines et cytokinines sur la caulogenèse.

3- ALLONGEMENT

3-1- Matériel végétal issu de vitro- semis

3-1-1- Effet des milieux et types d'explants sur la longueur des pousses feuillées

L'ensemble des milieux testés sur les différents explants mis en culture, n'ont eu aucune influence sur l'allongement des pousses feuillées.

Les résultats de l'analyse de la variance sont regroupés dans l'annexe 30. Un effet non significatif a été signalé pour les facteurs 1 (milieux) et 2 (explants) ainsi que la variance inter-factorielle.

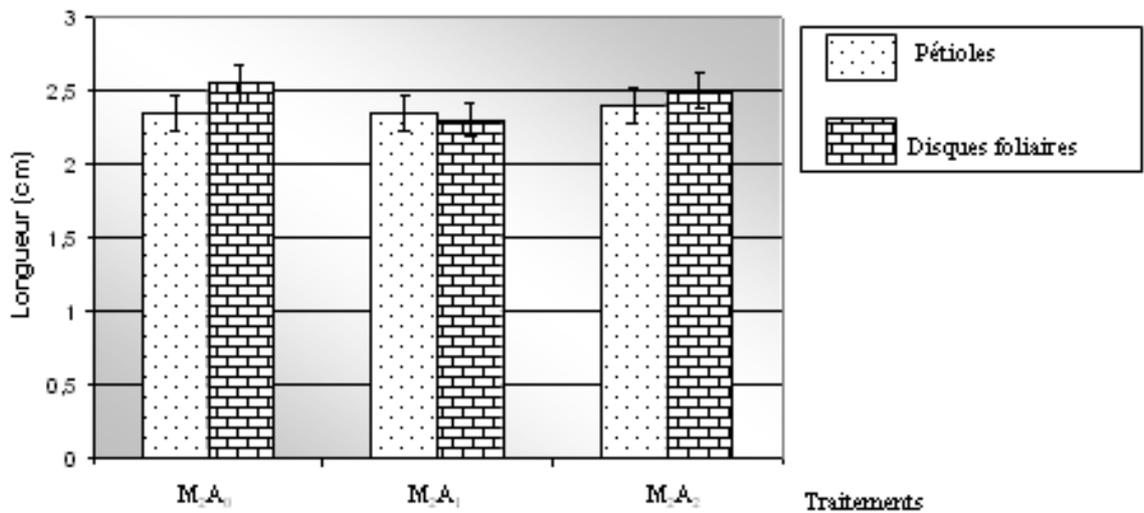


Figure 26 : Effet des différents milieux et types d'explants sur la longueur de pousses feuillées (in-vitro)

La figure 26 montre que les explants, pétioles et disques foliaires, réagissent de la même manière quelque soit le milieu.

Une moyenne de 2.36 cm a été enregistrée pour les explants de pétioles. Elle est de 2.45 cm pour les disques foliaires. Ces résultats sont proches, quelque soit le milieu de culture (Annexe 31).

3-2- Matériel végétal prélevé in-situ

3-2-1- Effet des milieux et types d'explants sur la longueur des pousses feuillées

Les résultats de l'analyse de la variance sont regroupés dans l'annexe 32. Ils nous ont permis de mettre en évidence l'action exercée par les 2 facteurs étudiés (milieux et explants) sur la longueur des pousses feuillées.

L'analyse statistique indique que pour le facteur 1 (milieux), un effet significatif est observé. Néanmoins, pour le facteur 2 (explants), le milieu a un effet non significatif sur l'allongement des pousses feuillées. Ainsi, nous avons observé que la réponse à l'allongement des pousses feuillées est identique quelque soit le milieu de culture utilisé.

L'annexe 33 montre aussi bien l'influence de deux types d'explants ainsi que celle des différents milieux utilisés sur la longueur des pousses feuillées.

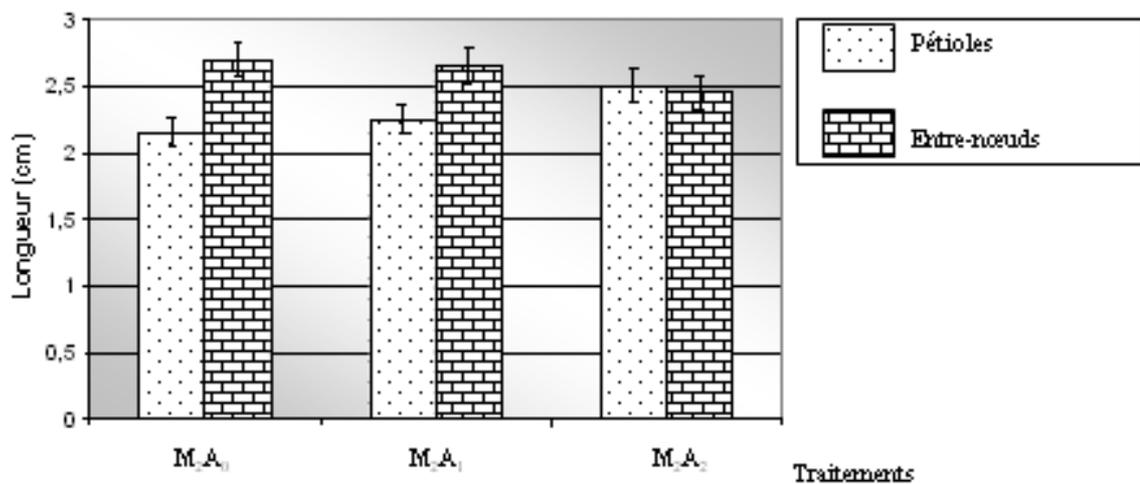


Figure 27: Effet des milieux et types d'explants sur la longueur des pousses feuillées

La figure 27 et l'annexe 33 permettent de conclure que ce sont les pousses feuillées développées à partir des entre-nœuds qui présentent un meilleur allongement, dont la moyenne de 2.60 cm.

Les pousses développées à partir de fragments de pétioles présentent un allongement légèrement plus faible avec une moyenne de 2.30 cm.

Nous constatons que la longueur des pousses feuillées est sensiblement identique dans les milieux M₂A₀, M₂A₁ et M₂A₂. Elle s'échelonne de 2.43 cm à 2.47 cm en moyenne.

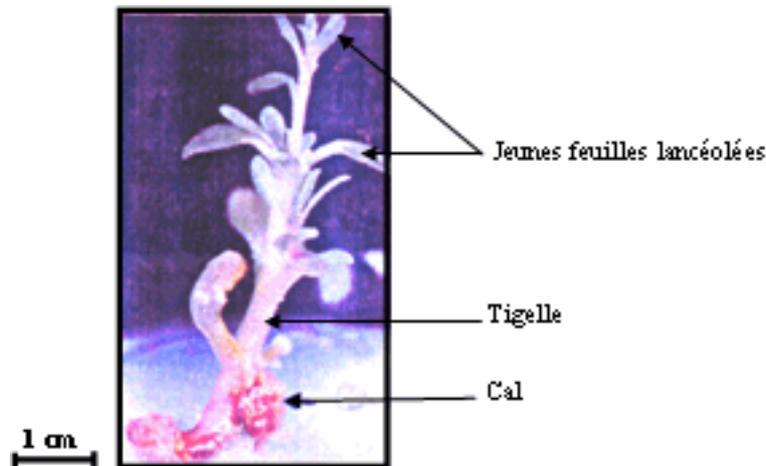


Figure 28 : Pousse feuillée issue de fragment d'entre nœud

Discussion

Les résultats de la phase d'allongement, ne montrent pas de différence significative entre l'allongement des pousses feuillées et ce pour les trois types d'explants testés (segments de pétiole, entre-nœuds et disques foliaires),

Nous remarquons que la longueur des pousses feuillées, sur les milieux avec ou sans AG₃ est sensiblement identique. Ce qui implique que la gibbérelline (AG₃ à 1 mg/l) utilisée seule (milieu M₂A₁) ou en association avec la BAP (milieu M₂A₂) n'a aucun effet sur la croissance des pousses feuillées.

Ces résultats confirment ceux obtenus par Xiao et al., (1991), sur la régénération du kiwi à partir de jeunes feuilles. Le milieu de base (témoin) a enregistré une longueur de pousses feuillées de 2.70 cm ± 0.14 cm comparé au milieu contenant l'AG₃ (M₂A₁) qui enregistre une longueur de pousses feuillées légèrement plus faible de 2.60 cm ± 0.21 cm.

Des recherches ont montré que les gibbérellines ont des effets différents, selon le type de tissu. A cet effet, Lang et al., (1959) signalent que l'AG₃ utilisée seule a une action inhibitrice sur la culture du parenchyme vasculaire du topinambour (*Helianthus tuberosus*). Selon Lafon et al., (1998), l'addition des auxines aux gibbérellines est indispensable pour le déboîtement des entre- nœuds en culture in-vitro.

4-RHIZOGENESE

Les résultats obtenus sur les différents types d'explants expérimentés (vitro-semis et in-situ) sont reportés dans le tableau 10.

Ces résultats sont exprimés en pourcentage de pousses feuillées ayant émis des radicelles.

	Milieu/explants	M ₁ R ₁	M ₂ R ₁	M ₂ R ₂	M ₁ R ₂
Explants prélevés à partir des vitro-semis	Pétioles	0	0	0	0
	Disques foliaires	0	60 %	0	0
Explants prélevés in-situ (arbres âgés de 20 ans)	Pétioles	0	0	0	0
	Entre- noeuds	0	0	0	0

Tableau 11: Variation du taux de pousses feuillées ayant émis des radicelles en fonction des différents milieux et types d'explants

Discussion

La phase d'enracinement a montré que, seules les plantules développées à partir d'explants de disques foliaires sur le milieu M₂R₁ (additionné de 0.5 mg/l d'AIA) ont développés des radicelles (Figure 29).

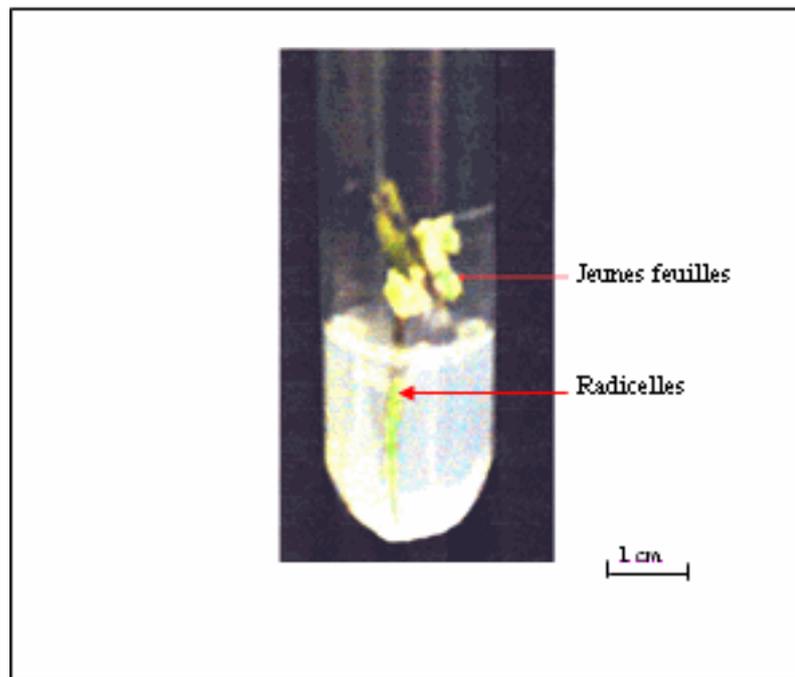


Figure 29 : Plantule avec pousse feuillée et radicelles.

Nous pouvons dire que la réponse à la rhizogenèse dépend du type d'explant, et de la concentration en régulateurs de croissance, en particulier en auxines.

D'après Tourte (1998), la formation des racines est souvent la phase la plus délicate. Elle est à l'origine des échecs dans la conduite de la culture in-vitro.

Les travaux de Yacoub et al., (2000), sur l'olivier (*Olea europea*) montrent que les racines se différencient mieux en présence l'ANA à 6 mg/l en comparaison avec la même concentration en AIA ou AIB.

Selon Ghorbel et al., (1994), la lumière n'est pas déterminante dans l'induction et l'initiation des racines. Au contraire, ils considèrent qu'un passage à l'obscurité pendant une semaine permet l'induction et l'initiation rapide des racines chez le pêcher (*Prunus persica*) et l'amandier (*Prunus amygdalus communis*).

Il apparaît donc que l'auxine peut être plus active sur l'induction des racines lorsque les plantules séjournent d'abord à l'obscurité. Leur passage par la suite sur un milieu dépourvu d'hormone évite la rétro-inhibition des racinelles par les auxines.

Comme le démontre l'expérience de Weij (1934) in Lafon et al., (1998), le transport de l'AIA est polarisé des apex vers les racines où l'hormone s'accumule. Au cours de son transport, l'AIA peut être dégradée par oxydation des auxines oxydases, et secondairement par la lumière.

5- BOURGEONNEMENT AXILLAIRE

5-1- Phase de multiplication des plantules de 8 semaines

Les 4 sub-cultures repiquées sur les différents milieux de multiplication ont permis d'obtenir un grand nombre de données qui sont mentionnées au niveau des figures¹ 30, 31, 32, 33 et 34. Celles-ci présentent le nombre de rameaux obtenus par explant, leur longueur et le degré de vitrification.

Le taux de la callogenèse et le taux d'enracinement des explants pour chaque type de milieu de multiplication à l'issue de chacune des 4 sub-cultures sont également mentionnés.

5-1-1- Nombre moyen de rameaux par explant

D'une sub-culture à l'autre, le nombre moyen de rameaux produits par explant semble varier de manière aléatoire sans qu'aucune tendance générale ne puisse être dégagée.

L'importance de la ramification apparaît cependant plus faible sur le milieu témoin dépourvu de substance à action cytokinique M_4Ba_0 (milieu de base : GMS). Elle est plus importante en présence de la BAP dans le milieu M_4Ba_5 ($GMS + 5 \mu M$ BAP) (Figure 30 et annexe 34).

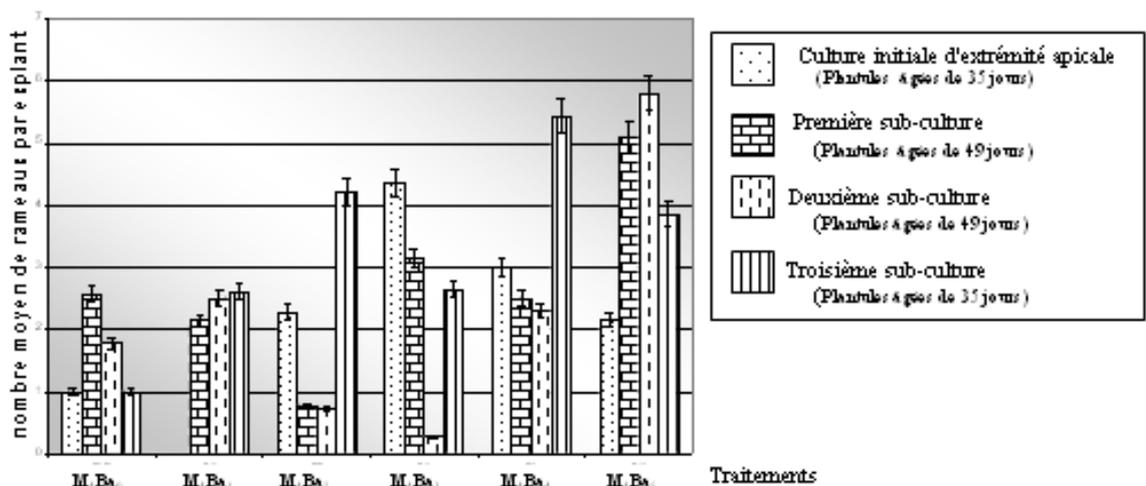


Figure 30: Effet du milieu et les différentes sub-cultures sur le nombre moyen des rameaux par explant

¹ Dans certaines figures les résultats concernant les premiers explants (extrémités apicales de plantules de 8 semaines) sont absents.

5-1-2- Longueur moyenne des rameaux par explant

La longueur moyenne des rameaux diminue au cours des sub-cultures (Figure 31 et annexe 35).

Le milieu de culture M_4Ba_0 (témoin) avec $1.7 \text{ cm} \pm 0.88 \text{ cm}$ dépourvu en régulateur de croissance est le plus favorable, pour la première sub-culture. Le milieu additionné de l'AIA à $5 \mu\text{M}$ (M_4Ba_4) et $2,5 \mu\text{M}$ (M_4Ba_3) donne les plus mauvais résultats avec respectivement $0.58 \text{ cm} \pm 0.08 \text{ cm}$ et $0.6 \text{ cm} \pm 0.45 \text{ cm}$ (Annexe 35).

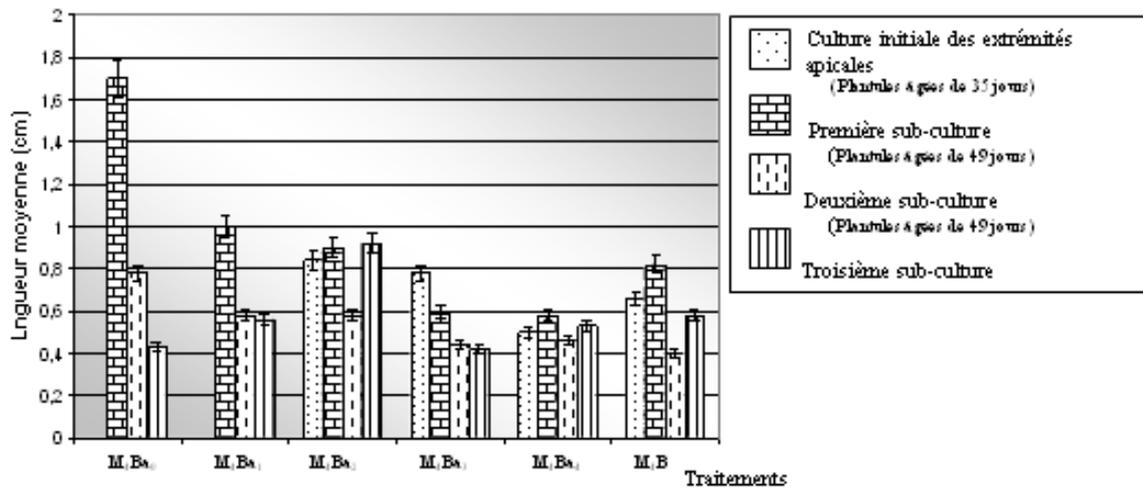


Figure 31 : Effet du milieu de culture et des différentes sub-cultures sur la longueur moyenne des rameaux par explant

5-1-3- Vitrification des rameaux

La vitrification des rameaux augmente nettement au cours de l'expérimentation. Elle est nulle (0 %) pour la culture initiale des extrémités apicales dans le milieu M_4Ba_0 (milieu témoin : (GMS). La vitrification devient importante pour les milieux riches en auxines et en cytokinines (Figure 32 et annexe 36).

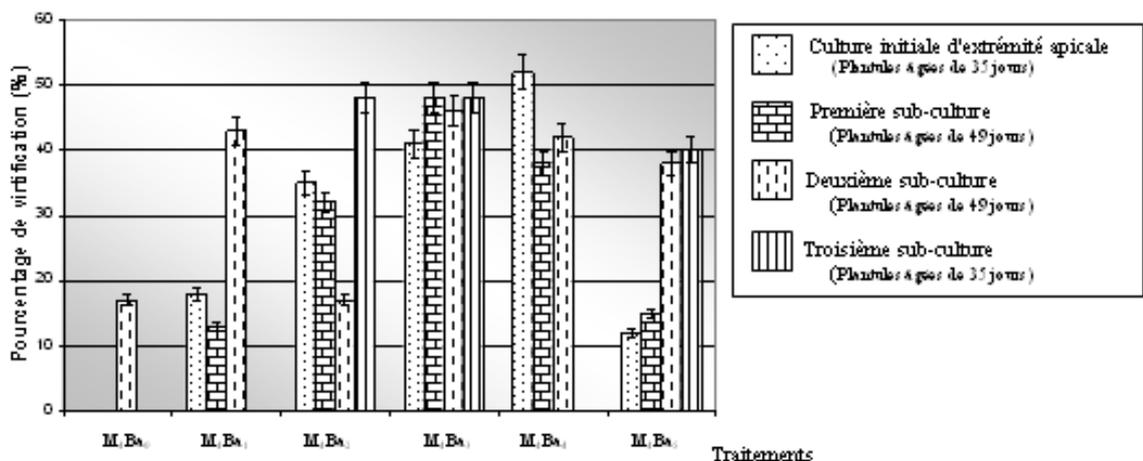


Figure 32 : Effet du milieu de culture et des différentes sub-cultures sur le taux de la vitrification des rameaux par explant

5-1-4- Taux de callogenèse des explants

Le taux de callogenèse, est très faible pour le milieu témoin (Figure 33 et annexe 37).

Des valeurs proches sont enregistrées pour les autres milieux, néanmoins, le milieu de culture M₄Ba₄ riche en auxine (5 µM AIA) présente des taux de callogenèse intéressants pour les trois sub-cultures. Ces derniers sont de 56 %, 77 % et 95 %.

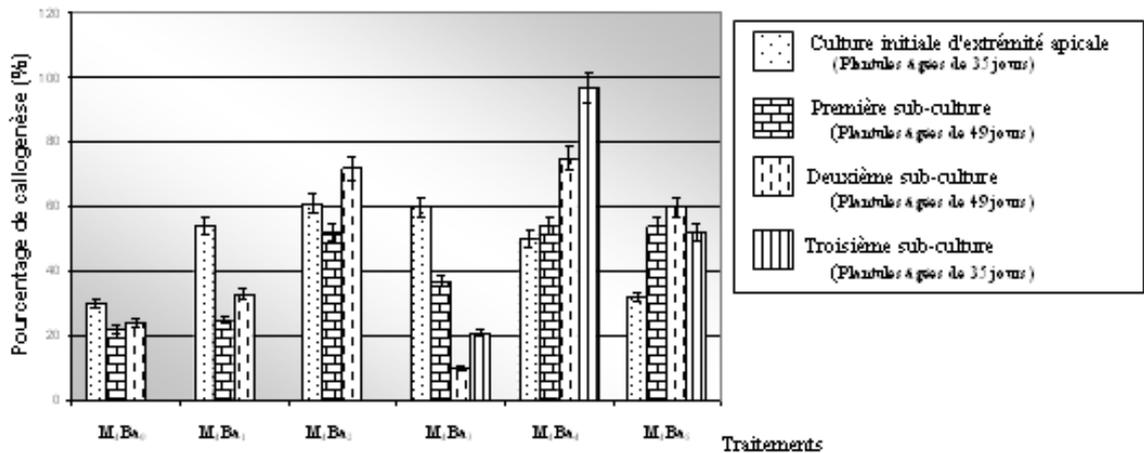


Figure 33 : Effet du milieu et des différentes sub-cultures sur le taux de la callogenèse des explants

5-1-5- Taux d'enracinement des explants

La figure 34 et l'annexe 38 montrent que le pourcentage des explants qui s'enracinent dans le milieu de multiplication diminue au cours des différentes sub-cultures.

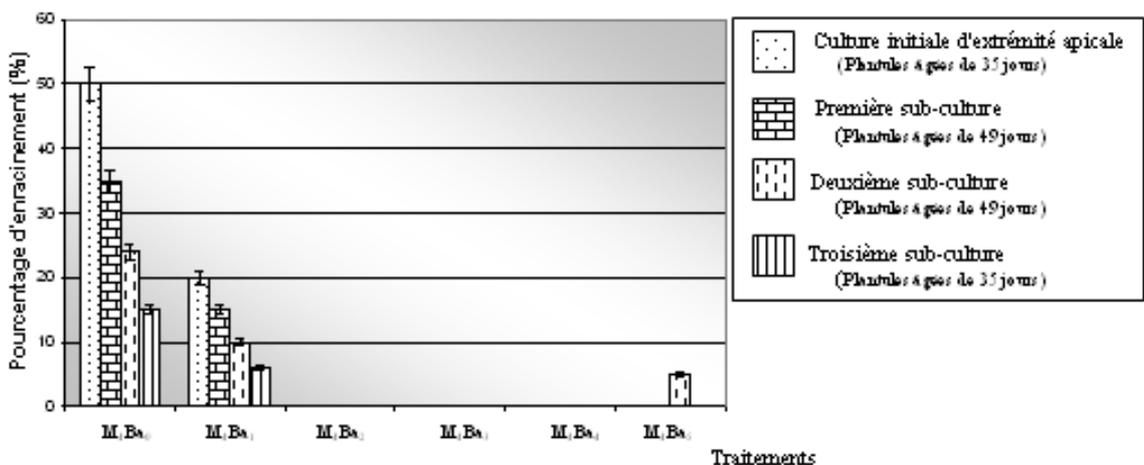


Figure 34 : Effet du milieu et les différentes sub-cultures sur le taux d'enracinement des explants

Le taux d'enracinement est élevé dans les milieux de multiplication contenant une concentration faible ou très faible en cytokinine.

Cette constatation a été observée sur le milieu M₄Ba₀, milieu témoin de GMS, et M₄Ba₁ milieu ayant une faible concentration en kinétine (0.5 µM).

Les milieux contenant l'auxine AIA (M₄Ba₃ et M₄Ba₄) ont enregistré des taux d'enracinement nuls (0%).

5-1-6 Phase d'enracinement des plantules âgées de 8 semaines

Les transferts des explants sur milieu d'enracinement (M₄Ba₆ et M₄Ba₇) ont été effectués à l'issue des deuxième et troisième sub-cultures de multiplication. Ces deux milieux ont permis l'amélioration des conditions d'émission des radicelles.

L'enracinement des rameaux issus de la deuxième sub-culture s'est déroulé par transferts successifs sur 2 milieux d'enracinement différents, l'un contient l'ANA à 5.37µM (M₄Ba₆) et l'autre, le milieu de Gamborg contient des macro-éléments dilués de moitié. Ce dernier contient 5.37µM de NAA et 2g/l de charbon actif

Les rameaux de la troisième sub-culture ont été en permanence maintenus sur le deuxième milieu (M₄Ba₇).

Les résultats obtenus sur ces 2 milieux sont illustrés au niveau des tableaux 11 et 12.

	M ₄ Ba ₀ (Témoin)	M ₄ Ba ₁	M ₄ Ba ₂	M ₄ Ba ₃	M ₄ Ba ₄	M ₄ Ba ₅
Moyenne des explants des extrémités apicales enracinés dans le milieu M ₄ Ba ₆ * et M ₄ Ba ₇	55%	22%	15%	0%	0%	10%

Tableau 12 : Taux d'enracinement des explants des extrémités apicales issus des différents milieux de multiplication à la 2^{ème} sub-culture

	M ₄ Ba ₀ (Témoin)	M ₄ Ba ₁	M ₄ Ba ₂	M ₄ Ba ₃	M ₄ Ba ₄	M ₄ Ba ₅
Moyenne des explants des extrémités apicales enracinés dans le milieu M ₄ Ba ₇ *†	0%	10%	0%	0%	0%	0%

Tableau 13 : Taux d'enracinement des explants d'extrémité apicale issus des différents milieux de multiplication à la 3^{ème} sub-culture.

Le tableau 11 montre que le milieu (M₄Ba₆) contenant uniquement du NAA (5,37 µM) est le plus propice pour l'enracinement.

Les explants des extrémités apicales montrent les meilleurs résultats de l'enracinement sur des milieux de multiplication dépourvus ou contenant de faibles concentrations en cytokinine. Il s'agit des milieux M₄Ba₀ (milieu témoin sans cytokinine) et M₄Ba₁ à 0.5 µM de kinétine.

L'AIA semble avoir un effet inhibiteur sur l'enracinement. En effet, les milieux enrichis en auxine M₄Ba₃ et M₄Ba₄ montrent un taux d'enracinement nul.

Le taux d'enracinement des explants des extrémités apicales issus de la troisième sub-culture montre que l'enracinement est nul (0 %) quelque soit le milieu de culture testé (Tableau 12). Exception faite pour le milieu de culture M₄Ba₁ contenant 0.5 µM de kin qui enregistre un taux d'enracinement très faible de 10 %.

5-2- Phases de multiplication des plantules âgées de 16 semaines

Vu les résultats favorables obtenus avec le milieu témoin sans régulateur de croissance et le milieu contenant de la BAP (5 μM), une deuxième expérience a été réalisée. Cette dernière permettra de mettre en évidence et de définir les effets des différentes concentrations de cytokinine testées (BAP) sur la multiplication des plantules.

Les figures 35 à 39 illustrent les données obtenues au cours de deux sub-cultures réalisées sur les explants obtenus par bourgeonnement axillaire.

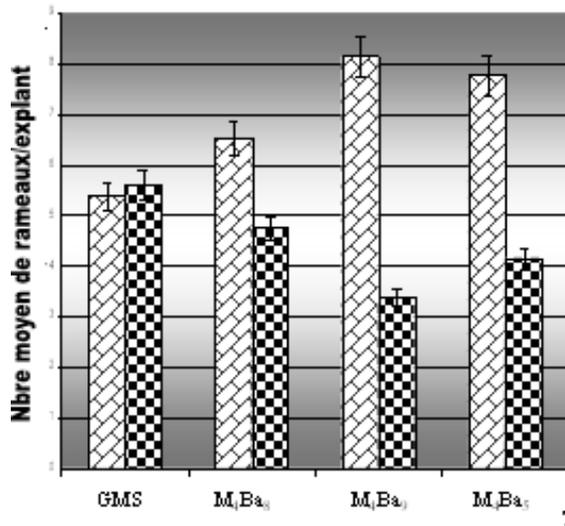


Figure 35 : Effet du milieu et des différentes sub-cultures sur le nombre moyen des rameaux par explant

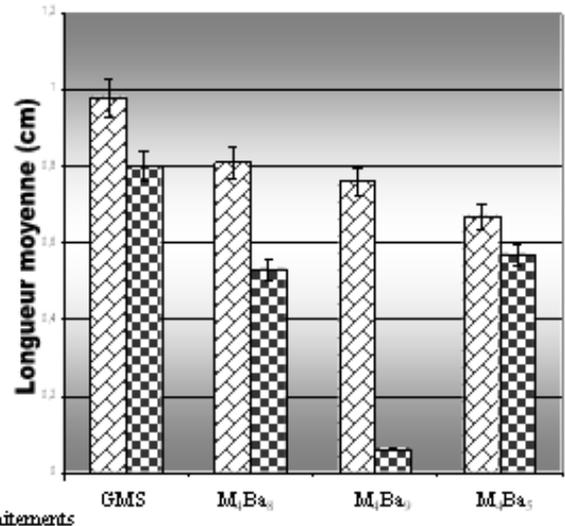


Figure 36 : Effet du milieu et des différentes sub-cultures sur la longueur moyenne des rameaux par explant

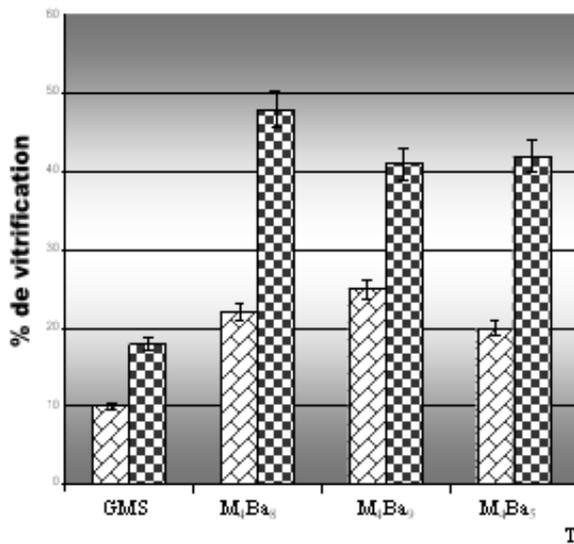


Figure 37 : Effet du milieu et des différentes sub-cultures sur le taux de la vitrification des rameaux par explant

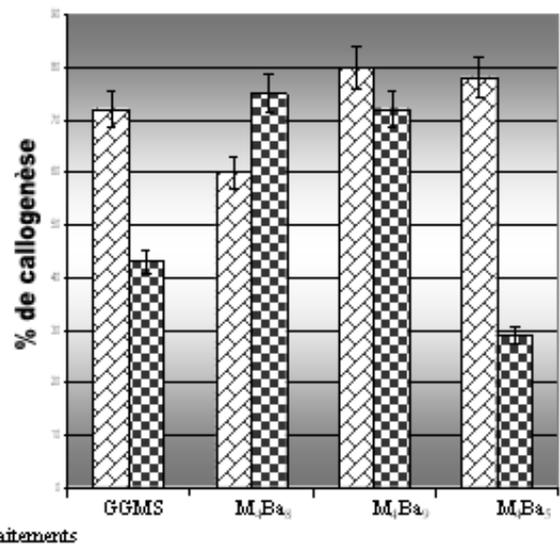


Figure 38 : Effet du milieu et des différentes sub-cultures sur le taux de la callogenèse des explants

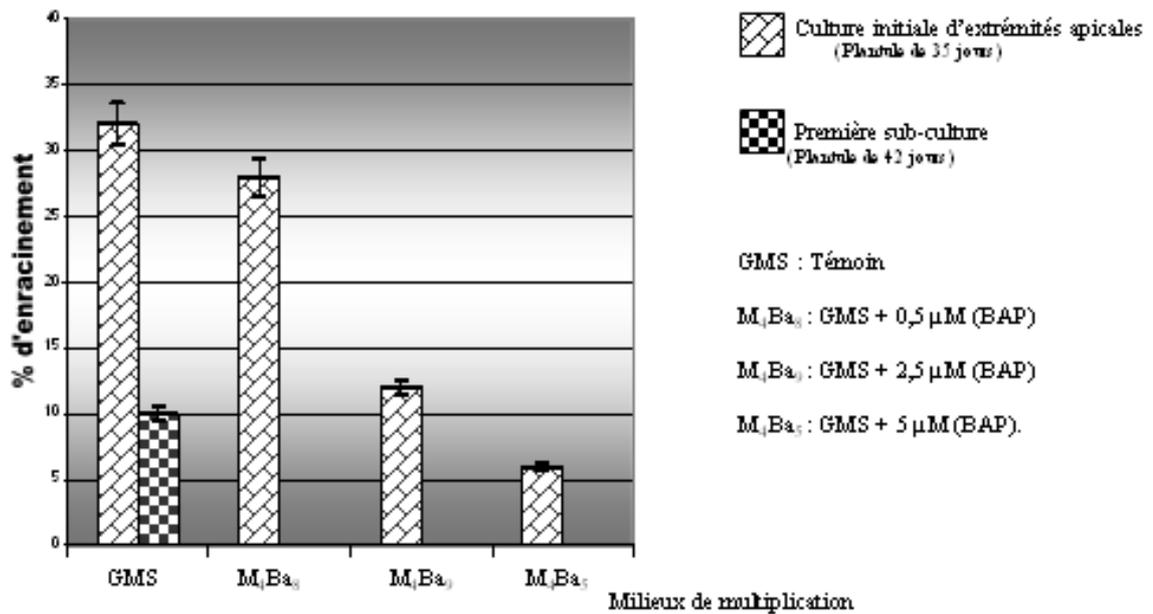


Figure 39 : Effet du milieu et des différentes sub-cultures sur le taux d'enracinement des explants

L'observation des figures 35, 36, 37, 38 et 39 montre une nette diminution de l'ensemble des paramètres étudiés de la première et la deuxième sub-culture à savoir :

- le nombre de rameaux axillaires produits,
- la longueur des rameaux axillaires,
- l'enracinement des explants sur les milieux de multiplication.

Nous avons observé le même résultat pour la callogenèse, à l'exception du milieu de culture M₄Ba₈ qui contient de la BAP (0.5 μM) qui donne un résultat inverse.

Le taux de la vitrification a tendance à augmenter durant la 2^{ème} sub-culture. Le milieu dépourvu en régulateur de croissance a fourni les résultats les plus intéressants avec des taux de multiplication des plantules élevés au cours des deux sub-cultures. En absence de la BAP (témoin), la longueur des ramifications axillaires produite est plus importante et le taux de vitrification est plus faible.

Les explants s'enracinent également plus facilement dans le milieu de multiplication en l'absence de BAP ou à une concentration faible de 0.5 μM, cas du milieu M₄Ba₈.

Sur les milieux contenant les cytokinines, la ramification est particulièrement stimulée au cours de la première sub-culture mais plus réduite au cours de la deuxième sub-culture. Il en résulte que le taux de multiplication moyen des plantules n'est pas différent de celui des témoins.

L'ensemble des paramètres évalués (nombre de rameaux, longueur des rameaux, taux de vitrification, taux de callogenèse et taux d'enracinement) n'ont pas été influencés par la concentration en BAP.

Un essai d'enracinement a été effectué pour les rameaux issus de la deuxième sub-culture mais les résultats obtenus ne sont pas satisfaisants. Cet échec est éventuellement dû au milieu M₄Ba₇ qui s'est déjà montré peu efficace lors du premier essai sur les plantules âgées de 8 semaines.

Discussion

Nous pouvons donc déduire qu'au cours des différentes sub-cultures, certains explants ont fournis des taux de multiplication anormalement élevés dans plusieurs milieux de cultures.

Notons que 10 à 15 rameaux axillaires repiqués sur un milieu d'AIA (5 μ M) ont été dénombrés sur certains explants issus de plantules âgées de 8 semaines.

Par ailleurs, nous avons constaté plus de 20 rameaux sur un explant repiqué sur un milieu contenant de la BAP (5 μ M).

La figure 40 illustre ce phénomène sur le milieu M₄BA₅ (GMS+5 μ M de BAP) au cours de la deuxième sub-culture. L'explant présente la formation d'un nombre anormalement élevé de rameaux axillaires. Ces derniers présentent des cals à la base.

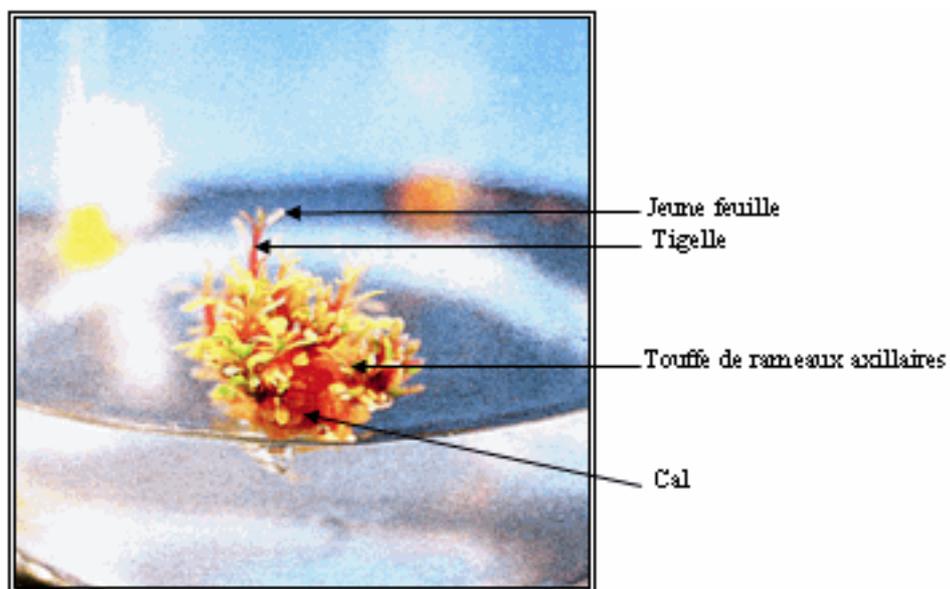


Figure 40 : Explant initialement issu de plantules âgées de 8 semaines.

Lorsque la production de rameaux est aussi importante, il est difficile de vérifier que tous sont issus de bourgeons axillaires étant donné que les explants dont ils proviennent forment aussi un cal à la base.

Le milieu témoin, mis à part le fait qu'il induit un taux de multiplication plus faible, il semble constituer un milieu intéressant.

Le milieu contenant de la BAP à 5 μ M (M₄BA₅) montre lui aussi des caractéristiques intéressantes pour la multiplication par bourgeonnement axillaire. En effet, par rapport aux autres milieux de culture, il induit le développement d'un nombre plus important de rameaux, avec une longueur moyenne appréciable et un taux de vitrification qui reste relativement faible.

Le taux d'enracinement est important dans les milieux de culture dépourvus en cytokininine, au cours des différentes sub-cultures chez les explants des extrémités apicales.

Un essai d'acclimatation des plantules enracinées a donné d'excellents résultats (CHAOUIA, 2007).

CHAPITRE 2 : EMBRYOGENESE SOMATIQUE

1- Embryogenèse somatique directe

1-1- Tigelles

Suite aux traitements d'induction, les explants des deux séries (exposition de 7 jours ou 14 jours dans un milieu M₅ (M₁ + 25 µM de 2.4-D) ont présenté un aspect quasi-identique.

Des boursoflures sont apparues à la surface des explants issus des fragments de tige. Elles sont plus marquées chez les explants traités durant 14 jours.

- Après une exposition de 7 jours dans un milieu contenant 25 µM de 2.4-D, le traitement de développement sur le milieu M₆ (M₁ + 750 mg de glutamine) a favorisé l'apparition de cal sur 90 % des explants parmi lesquels, 58 % présentent des radicelles.
- Suite à une durée de traitement de 14 jours, tous les explants ont produit des cals, seulement 20 % ont différencié des racines.

Le traitement avec le milieu M₇ (M₁ + 5.37 µM (NAA) + 2.5 µM AG₃) n'a pas modifié le mode de développement des explants. Ces derniers, ont continué à former des radicelles et des cals qui au cours de l'expérimentation brunissaient et s'arrêtaient de croître.

Les coupes histologiques réalisées sur des explants ayant subi les deux traitements d'induction dont les durées sont respectivement de 7 et 14 jours n'ont pas révélé la présence d'embryon somatique en développement.

1-2- Cotylédons

Un comportement similaire à celui des tigelles a été observé pour les cotylédons au moment du traitement d'induction.

- Un nombre important d'explants présentait des boursoflures. En effet, après un traitement d'induction de 7 jours, 25 % des explants ont formé des cals. La proportion des cals qui présentaient des radicelles est de 50 %.
- Dès le repiquage sur le milieu de développement M₆, un cal bien visible a été observé sur quelques explants dont le traitement d'induction au 2.4-D a duré 14 jours. Il y a eu formation de 70 % de cals dont 20 % présentent des radicelles. L'analyse histologique a montré deux amas de cellules méristématiques. Ces derniers sont bien délimités sur des cals formés par les explants de cotylédons (Figures 41 et 42).

Le dernier traitement avec le milieu M₇ a eu le même effet que celui utilisé pour les tigelles. Il n'a eu aucun effet sur le développement des embryons.

Quelques cals ont poursuivi leur développement. Ils sont de couleur beige-vert. Nous avons observé quelques radicelles.

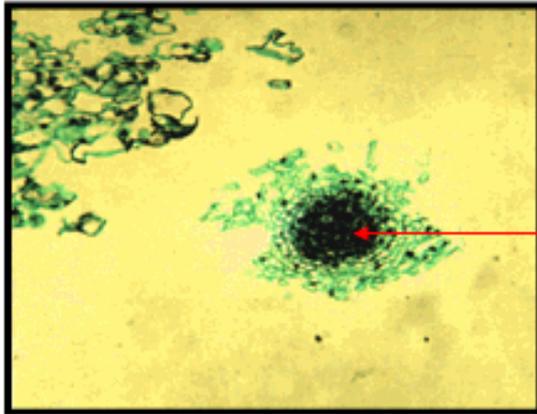


Figure 41 : Grossissement : 185x

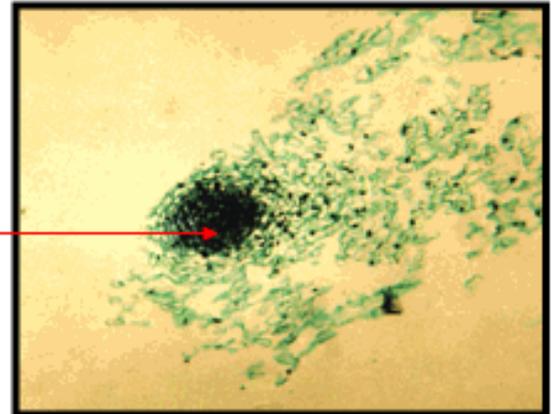


Figure 42 : Grossissement : 175x

1 : Amas méristématiques diffus

Amas méristématiques au sein d'un cal formé sur un segment de cotylédon d'une plantule âgée de 25 jours. L'explant (fragment d'un cotylédon) a passé 14 jours dans le milieu contenant 25 μ M de 2.4-D (M₅) puis 6 semaines sur un milieu dépourvu de régulateurs de croissance mais contenant 750mg/l de glutamine (M₆).

Notons que ces structures ne concernent pas l'embryogenèse somatique directe.

1-3- Feuilles

Les différents temps d'induction testés ne montrent aucun effet sur l'explant (disques foliaires). Néanmoins, nous avons pu observer quelques légères boursouflures.

- A la fin du traitement d'induction de 7 jours sur le milieu M₆, nous avons observé que 45 % des explants (disques foliaires) montrent des cals de couleur brune. Ces derniers ont une proportion d'enracinement de 15 %. Les explants induits durant 7 jours ont vu non seulement la croissance des cals stoppée, mais il n'y a pas eu aussi production de radicelles.
- Les explants ayant subi une induction de 14 jours montrent une meilleure callogenèse. En effet, 80 % des explants (disques foliaires) ont formé des cas de couleur brun-beige. Cependant aucun des cals formés n'a produit de radicelles. Les explants évoluant sur le milieu M₅ montrent que parmi les cals formés, seulement 25 % présentent des radicelles. La formation des cals est aussi stoppée, comme ceux induits durant une période de 7 jours.

L'analyse histologique des explants prélevés sur milieu de culture M₆, n'a pas révélé de structures biologiques intéressantes.

2- Embryogenèse somatique indirecte

2-1- Feuilles issues de plantules âgées de 8 semaines (station de Boufarik)

La formation de cal sur le milieu d'induction a été beaucoup plus efficace sous une photo période (PP) de 16 heures. En effet, les taux de callogenèse suivants ont été observés :

- 60 % des explants pour le milieu d'induction M₈ (M₁ +2.4-D, 4,5 µM; Kin, 4,65 µM; 8 g/l Agar), PP de 16 heures
- 65 % des explants pour le milieu d'induction M₉ (M₁ +2.4-D, 4,5 µM; Kin, 4,65 µM; 12 g/l Agar) PP de 16 heures
- 25 % des explants pour le milieu d'induction M₈, à l'obscurité
- 15 % des explants pour le milieu d'induction M₉, à l'obscurité mais suite aux infections bactériennes nous avons été contraint à éliminer les cals.

L'aspect des cals exposés à une PP de 16 heures pendant l'induction embryogène, était très semblable pour les deux milieux (M₈ et M₉). Les cals étaient de couleurs vert, beige et brun. Ils sont très friables, avec souvent de petits points verts foncés à l'intérieur du cal.

Les cals sur M₉ étaient, cependant, beaucoup plus secs en apparence à cause de la forte teneur en Agar et donc du potentiel hydrique plus faible.

Des radicelles se sont développées sur les explants (disques foliaires) dans les milieux M₈ et M₉ à l'obscurité. Les cals sont de couleur beige à texture très friable. La figure 43 et l'annexe 39 présentent les RGR moyens sur 3 sub-cultures.

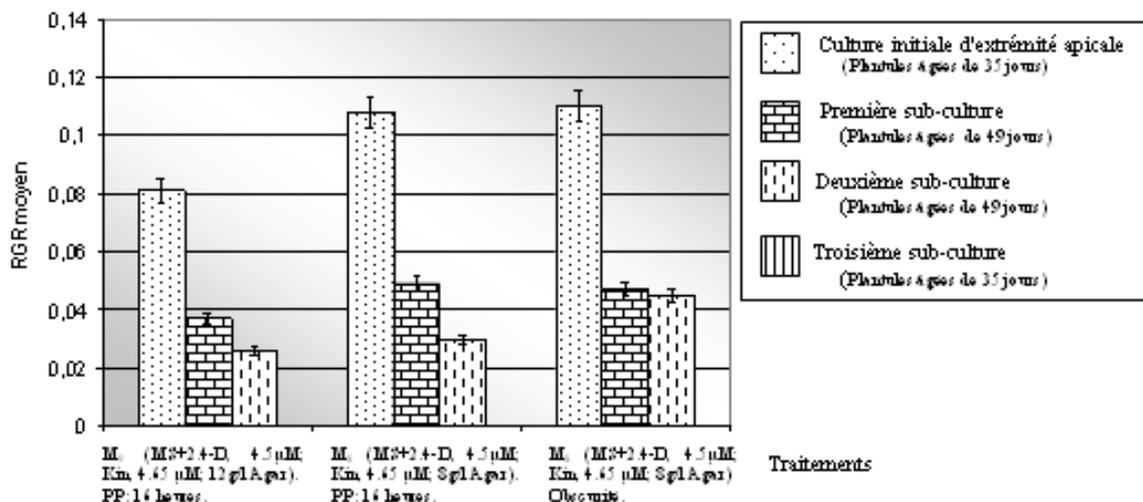


Figure 43 : Taux de croissance relatif (RGR) moyen de cals issus de disques foliaires de plantules âgées de 8 semaines. (Le RGR est calculé sur la base du poids frais)

En moyenne, le RGR le plus élevé est obtenu avec le milieu M₈ à l'obscurité. Nous observons une tendance générale à la diminution du taux de croissance relatif au cours des différentes sub-cultures.

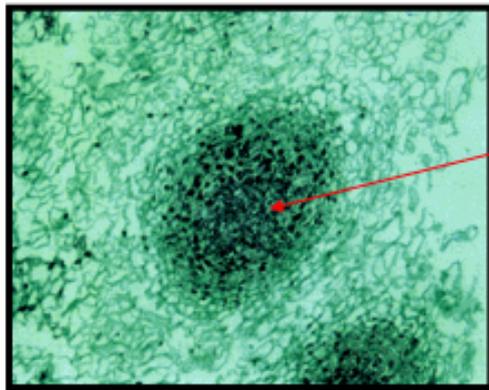
Une analyse histologique a révélé la présence de masses méristématiques assez bien délimitées de forme ovale. Des 6 cals transférés sur le milieu M₈, seulement 5 cals ont révélé des masses méristématiques.

De même, des 7 cals repiqués sur le milieu M_0 , seulement 6 cals ont révélé des masses méristématiques.

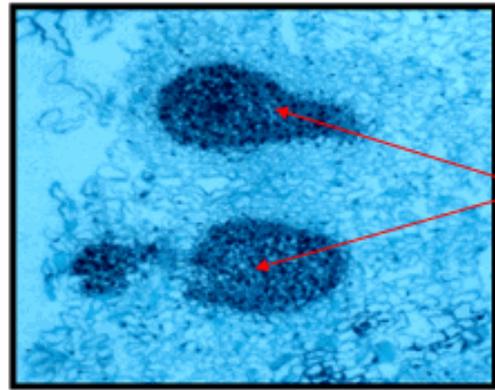
Cette constatation a été observée sous une PP de 16 heures, aussi bien sur le milieu de culture M_0 que le milieu M_0 .

Les figures 44 et 45 montrent des amas méristématiques au sein du cal primaire induit sur des disques foliaires mis en culture sur les milieux M_0 et M_0 sous une PP de 16 heures.

Notons que les explants proviennent de plantules âgées de 8 semaines.



1 : Masses méristématiques délimitées

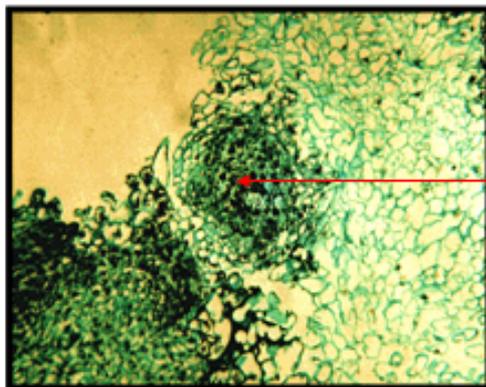


2 : Masses méristématiques délimitées et organisées

Figure 44 : Amas méristématique induit sur le milieu de culture M_0 ($M_0 + 4.5 \mu M$ de 2.4-D+ $4.65 \mu M$ (kin) + 8 g/l Agar) sous une PP de 16H. Grossissement : 155x

Figure 45 : Deux amas méristématiques induit sur le milieu de culture M_0 ($M_0 + 4.5 \mu M$ de 2.4-D+ $4.65 \mu M$ (kin) + 12 g/l Agar) sous une PP de 16 H. Grossissement : 160x

Des cals primaires issus repiqués sur des milieux M_0 et M_0 à l'obscurité ont ainsi donné naissance à des masses méristématiques bien délimitées qui sont illustrées dans les figures 46 et 47.



1 : Masses méristématiques délimitées

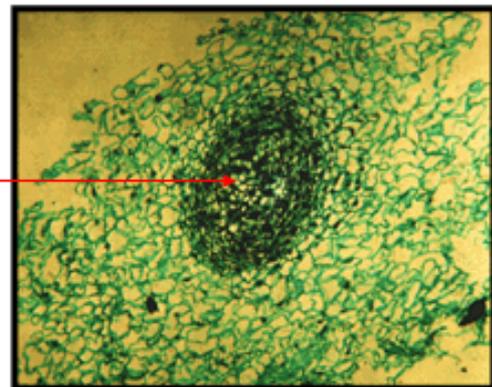


Figure 46 : Amas méristématique induit sur le milieu de culture M_0 ($M_0 + 4.5 \mu M$ de 2.4-D+ $4.65 \mu M$ (kin) + 8 g/l Agar) à l'obscurité. Grossissement : 150x

Figure 47 : Amas méristématique induit sur le milieu de culture M_0 ($M_0 + 4.5 \mu M$ de 2.4-D+ $4.65 \mu M$ (kin) + 12 g/l Agar) à l'obscurité. Grossissement : 185x

Parmi toutes ces structures observées de nombreux amas méristématiques très diffus étaient aussi visibles ainsi que des amas irréguliers suggérant un processus de « bourgeonnement ».

Les traitements de développement et de maturation ont conduit à de nombreuses observations qui sont résumées dans les tableaux 13 et 14. Tous les cals observés étaient très friables. Les milieux M₁₀ et M₁₁ contiennent de la kinétine. Les milieux M₁₂ et M₁₃ contiennent de la kinétine et de l'ABA (Annexe 5).

Traitement	Observation
M _S - M ₁₀ - M ₁₀ - M ₁₀	- le cal verdit avec apparition de quelques tâches rouges et d'une racine - Brunissement du cal et disparition des zones vertes
M _S - M ₁₀ - M ₁₂ - M ₁₂	- cal brun avec des zones vertes persistantes
M _S - M ₁₂ - M ₁₂	- le cal reste d'abord beige brun - apparition de zones vertes en fin de traitement

Tableau 14 : Effets qualitatifs des milieux de développement et de maturation sur les cals issus du milieu M_g à l'obscurité

Traitement	Observations
$M_8 - M_{10} - M_{10} - M_{10}$	<ul style="list-style-type: none"> - des racines, des masses et des zones vertes apparaissent sur certains cals - brunissement des cals et disparition de certaines zones vertes compactes en fin de traitement
$M_8 - M_{10} - M_{12} - M_{12}$	<ul style="list-style-type: none"> - les points verts foncés à l'intérieur du cal disparaissent, le cal devient beige avec un duvet blanchâtre en surface - brunissement du cal, quelques zones vertes compactes subsistent en fin de traitement
$M_9 - M_{11} - M_{11} - M_{11}$	<ul style="list-style-type: none"> - les racines deviennent plus nombreuses - apparition de zones et masses vertes compactes surtout en surface - développement d'un duvet blanchâtre à la surface de certains cals - brunissement en fin de traitement
$M_9 - M_{11} - M_{13} - M_{13}$	<ul style="list-style-type: none"> - le cal devient brun foncé mais des masses compactes et un duvet blanchâtre se développent sur certaines surfaces - diminution du nombre de zones et masses vertes compactes en fin de traitement
$M_8 - M_{12} - M_{12}$	<ul style="list-style-type: none"> - le cal est beige au centre - apparition de quelques zones et masses vertes compactes surtout en surface
$M_8 - M_{13} - M_{13}$	<ul style="list-style-type: none"> - apparition de masses vertes compactes surtout en surface avec parfois un duvet blanchâtre

Tableau 15 : Effets qualitatifs des milieux de développement et de maturation sur les cals issus des milieux M_8 et M_9 sous une PP de 16 heures.

L'observation macroscopique des cals a été complétée par une analyse histologique à la fin de la quatrième sub-culture. Pour chaque traitement, (Tableaux 13 et 14) deux cals différents ont été sélectionnés.

Les observations microscopiques ont révélé la présence de structures diverses mais non spécifique à chaque traitement. Parmi celles-ci, de nombreux amas méristématiques assez diffus avec parfois au centre des trachéides et des fibres sont visibles. Des amas assez bien délimités similaires à ceux observés sur les milieux d'induction sont aussi observés. Les trachéides ont tendance à s'organiser en réseaux. Cette organisation peut être associée à une organogenèse caulinaire ou racinaire en développement. Une observation à fort grossissement montre une certaine dégénérescence des cellules méristématiques dont le cytoplasme est condensé. Parmi toutes les lames observées, aucun embryon en développement n'a été repéré.

2-2- Feuilles issues de plantules de 16 semaines (station de Boufarik)

Les explants prélevés sur des plantules âgées de 16 semaines ont montré une meilleure aptitude à la callogenèse en comparaison à celle des jeunes feuilles des plantules âgées de 8 semaines.

En effet, sur le milieu d'induction M_8 , nous observons 75 % des explants (disques foliaires) qui ont formé des cals sur le milieu d'induction M_9 .

Cependant, pour les 2 milieux d'induction (M_8 et M_9), les cals formés se sont avérés beaucoup moins volumineux. Ils sont de couleur blanc-crèmeux avec des points verts.

Le RGR moyen présenté dans la figure 48 et défini au cours de la première sub-culture est supérieur sur milieu d'induction (M_8) confirmant ainsi les résultats obtenus (Annexe 40).

L'analyse histologique confirme également les résultats obtenus avec les cals issus des disques foliaires prélevés à partir de jeunes feuilles de plantules âgées de 8 semaines.

En effet, des amas de cellules méristématiques assez bien délimités, de forme ovale, ont été observés suite aux 2 traitements d'induction (2 cals par traitement). La figure 49 illustre les amas méristématiques du milieu M_8 et la figure 50 celle du milieu M_9 .

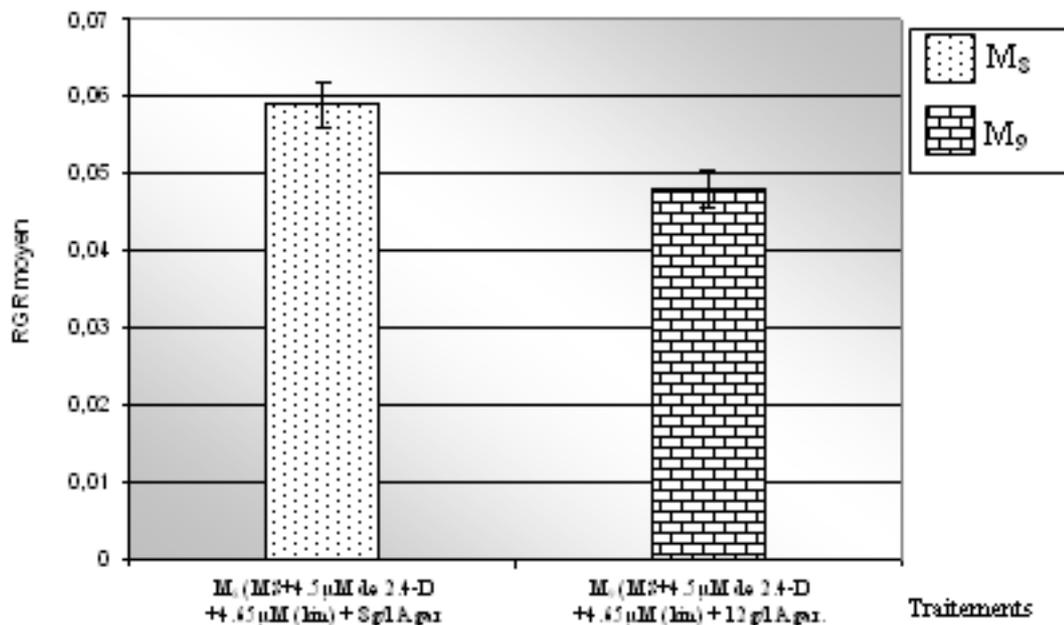
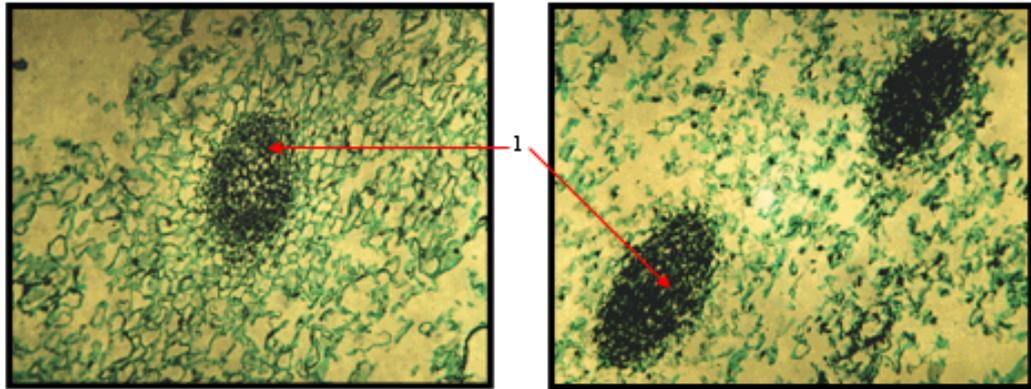


Figure 48 : Effet du milieu d'induction sur le taux de croissance relatif (RGR) moyen des cals issus de feuilles de plantules âgées de 16 semaines



1 : Cellules méristématiques bien délimitées de forme ovale

Figure 49 : Amas méristématique au sein du cal primaire induit sur des disques foliaires mises en culture sur le milieu $M_1 + 4.5 \mu M$ de 2.4-D + $4.65 \mu M$ (kin)tt, 8 g/l Agar (M_1) sous une photopériode de 16 heures. Les explants proviennent de plantules âgées de 16 semaines. Grossissement : 220x

Figure 50 : Deux amas méristématiques au sein du cal primaire induit sur des disques foliaires mises en culture sur le milieu $M_1 + 4.5 \mu M$ de 2.4-D + $4.65 \mu M$ (kin)tt, 12 g/l Agar (M_1) sous une photopériode de 16 heures. Les explants proviennent de plantules âgées de 16 semaines. Grossissement : 210x

D'autres amas beaucoup plus diffus ont aussi été observés ainsi que des amas en bourgeonnement.

Un seul traitement de développement et de maturation a été effectué pour chaque traitement d'induction. Les observations sont synthétisées dans le tableau 15.

Traitement	Observations
$M_8 - M_{11} - M_{12}$	- Tâches rouges apparaissant sur certains cals - Quelques radicelles apparaissent parfois - Brunissement du cal en fin de traitement
$M_9 - M_{13} - M_{13}$	- Apparition des tâches rouges mais avec plus de radicelles et des masses vertes compactes sur le cal

Tableau 16: Effets qualitatifs des milieux de développement et de maturation sur des cals issus de feuilles de plantules âgées de 16 semaines.

Les cals obtenus sont très friables. Les traitements de développement et de maturation n'ont pas apporté d'important changements au niveau des structures présentes dans le cal.

Ainsi, nous observons moins d'amas méristématiques organisés. Aucun embryon somatique en développement n'a été observé.

2-3- Feuilles issues de plantules âgées de 8 semaines (station de Jourdain, Toulouse)

De nombreuses cultures ont dû être éliminées suite à un important problème d'infections fongiques et bactériennes pendant la culture des disques foliaires. Dans les boîtes de Pétri

non contaminées nous avons observé des taux de callogenèse de 45 % pour le milieu M_8 et de 50 % pour le milieu M_9 . Les cals formés étaient peu volumineux et de couleurs beige à vert avec parfois des points verts foncés au centre. Le RGR moyen des cals des 2 sub-cultures induits sur ces milieux est sensiblement le même (Figure 51 et annexe 41).

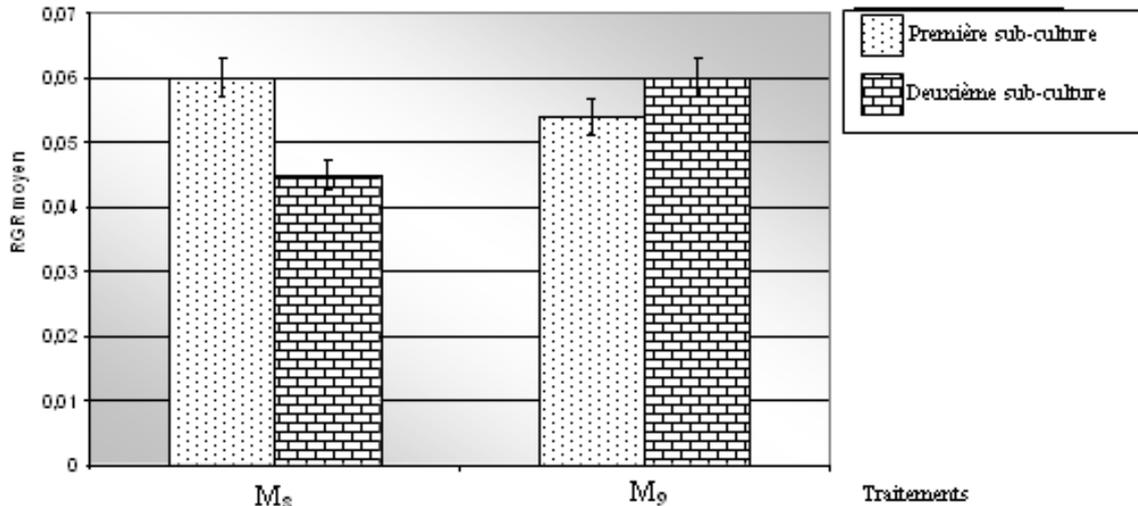


Figure 51 : Taux de croissance relatif (RGR) moyen de cals issus de disques foliaires sur milieux d'induction (Station de Jourdain, de Toulouse).

L'étude histologique de cals primaires sur les deux milieux d'induction (M_8 et M_9) n'a pas permis de mettre en évidence des amas méristématiques bien délimités.

Les observations liées aux différents traitements de développement et de maturation sont reprises dans le tableau 16.

Tous les cals observés avaient un aspect friable.

Tableau 17 : Effets qualitatifs des milieux de développement et de maturation des cals issus de disques foliaires (Station de Jourdain, de Toulouse)

Traitement	Observation
M ₈ – M ₁₀ – M ₁₀ – M ₁₀	- Apparition de radicelles sur certains cals - Apparition de masses vertes compactes en surface - brunissement du cal
M ₈ – M ₁₀ – M ₁₂ – M ₁₂	-Apparition de masses vertes compactes en surface sur certains cals - Brunissement des cals au cours du traitement
M ₉ – M ₁₁ – M ₁₁ – M ₁₁	- Brunissement du cal avec des zones vertes - Développement de masses vertes compactes en surface
M ₉ – M ₁₁ – M ₁₃ – M ₁₃	- Brunissement du cal, et présentant de masses vertes compactes en surface - Brunissement du cal
M ₈ – M ₁₂ – M ₁₂	- le cal brunit légèrement et un duvet blanc apparaît sur certaines surfaces - apparition de zones vertes compactes et brunissement du cal en fin de traitement
M ₉ – M ₁₃ – M ₁₃	- Brunissement du cal avec apparition de zones vertes compactes en surface.

L'étude histologique (2 cals par traitement) révèle l'absence d'embryon en développement. Seules des structures de forme ovale avec des cellules non-méristématiques à parois épaisses ont été observées.

3- DISCUSSION ET PERSPECTIVES

3-1- Embryogenèse somatique directe

L'auxine 2.4-D n'a pas stimulé l'induction directe d'embryons somatiques pour les tigelles, les cotylédons et les jeunes feuilles de *Actinidia chinensis* PL.

Selon BARNA et WAKHLU, (1995_a) le 2.4-D a donné d'excellents résultats sur des folioles de pois chiche (*Cicer arietinum* L.) où les embryons somatiques ont été obtenus avec une concentration de 5 mg/l.

Cependant, ce n'est qu'après un transfert sur un milieu enrichi de glutamine (M₆) que la callogenèse s'est manifestée. Elle est présente pour chaque type d'explant (segments de tigelle, fragments de cotylédon et disques foliaires) et pour chaque durée d'exposition au 2.4-D (7 et 14 jours).

Pour l'ensemble des traitements testés, où les explants étaient exposés plus longtemps au 2.4-D, le nombre de cals était appréciable mais avec une rhizogenèse faible.

L'effet stimulant du 2.4-D sur la callogenèse et inhibiteur d'ESD a déjà été observé par Têtu et al., (1987) chez la betterave (*Beta vulgaris*). Durant notre essai, sur la callogenèse de l'*Actinidia*, nous avons fait les mêmes observations. L'inhibition de la rhizogenèse lors de longues expositions pourrait aussi être liée à la forte concentration utilisée. En effet, Bahki et Lesly, 1980 in GEORGE, (1993) ont mis en évidence qu'une concentration élevée en

2.4-D avait un effet inhibiteur sur la capacité rhizogène des cals de tomate (*Lycopersicum esculentum* L.). Ce résultat a été confirmé lorsque la durée d'induction est courte (1 jour).

Une concentration plus faible en 2.4-D avec de longues périodes d'induction favorise la formation de radicelles.

WALALI et al., 2007 soulignent que sur les cotylédons de l'olivier (*Olea europea* cv Picholine), un milieu gélosé additionné de 5 mg/l d'ANA, favorise le développement des cals et la régénération des explants par embryogenèse somatique.

Nous pouvons donc envisager de nouveaux essais d'ESD avec d'autres protocoles expérimentaux.

La présence d'amas méristématiques dans les cals des entre-nœuds (Fragments de tige) induits pendant 14 jours révèle un éventuel organogène de ces cals en un potentiel embryogène.

3-2- Embryogenèse somatique indirecte

Un fait important a été établi suite aux deux essais réalisés sur de disques foliaires issues de plantules et sur des graines extraites de fruits mûrs (station de Boufarik, Algérie). Tous les cals, sous une PP de 16 heures, repiqués sur les 2 milieux de culture (M₈ et M₉) contenant respectivement 8 ou 12 g d'Agar par litre, enrichi en 2.4-D et en kinétine ont produit des amas méristématiques. Ces derniers sont bien délimités et présentent en général une forme ovale.

Cependant, nous ne possédons pas encore assez d'évidence pour affirmer le caractère embryogène de ces amas.

Notons que par rapport aux différents essais réalisés jusqu'à présent en embryogenèse somatique chez les arbres fruitiers (ETIENNE et al., 1998), ce résultat constitue un élément nouveau et important. En effet, il n'est pas mentionné dans la bibliographie qu'un cal se développe en tissu méristématique de manière reproductible chez l'Actinidia.

Les différents traitements de développement et de maturation ont à nouveau provoqué l'apparition de masses vertes et compactes à la surface ou au sein du cal. Ces masses ont abouti à une ébauche d'organogenèse caulinaire. Elles pourraient éventuellement indiquer une capacité organogène ou embryogène du cal (CHAOUIA, 2008).

Si les amas méristématiques présents au sein des cals sont véritablement embryogènes, il est donc évident que ce sont les étapes de développement et de maturation des embryons somatiques qui sont limitantes.

Pour contourner cet obstacle, nous avons certaines possibilités notamment :

- Le transfert sur un milieu dépourvu en régulateur de croissance
- Augmenter le rapport cytokinine/auxine (GEORGE, 1993/1996)
- Soumettre le cal à un stress somatique avec l'utilisation de concentrations élevées en saccharose. Ce dernier s'est révélé capable de stimuler le développement des embryons somatiques (GEORGE, 1993/1996) ; MERKELE et al., (1995).

La capacité embryogène d'un cal dépend souvent du génotype (BROWN et al., 1995) ce qui pourrait expliquer ainsi le contraste entre les résultats de l'analyse histologique réalisée pour les cals primaires originaires de la station de Boufarik (Algérie) et ceux de la station de Jourdain de Toulouse (France). L'effet du génotype peut aussi inter-réagir

avec le milieu ou les conditions environnementales de la culture (BROWN et al., 1995). En l'occurrence, il est probable que les exigences culturales des explants originaires de la station de Jourdain soient différentes pour l'obtention d'amas méristématiques à caractère éventuellement embryogénique.

Ces résultats permettent d'associer l'acquisition du potentiel embryogène à l'élaboration d'une balance hormonale spécifique pour les cals d'Actinidia.

Une analyse des cytokinines endogènes des cals embryogènes et non embryogènes doivent être réalisées pour compléter cette approche.

CHAPITRE 3 : LA CULTURE DU MERISTEME

Les cellules méristématiques se multiplient activement sans aucune polarité de division et constituent ainsi un petit massif généralement de forme globuleuse à l'origine, qui augmente rapidement de taille (FABRE, 1977).

1- Evolution du méristème

Un mois après la mise en culture du dôme méristématique (phase d'initiation) et de la région organogène, une prolifération cellulaire interne est observée (Figure 53).

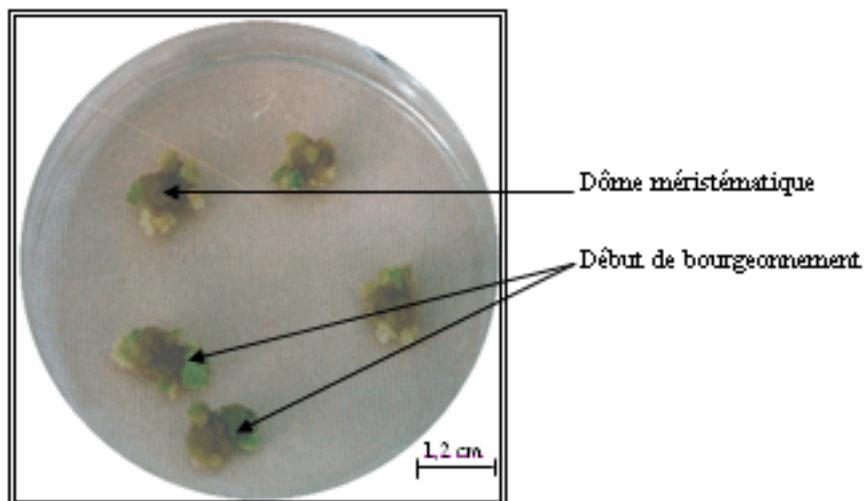


Figure 53 : Phase d'initiation (Après un mois dans le milieu de Barlass)

Durant cette étape, trois phases d'évaluation se succèdent.

1-1- Phase de bourgeonnement et comportement de l'Actinidia

Les vitro plants, en forme de rosette présentent un aspect de touffe avec un bourgeonnement axillaire important à la base (Figure 54).

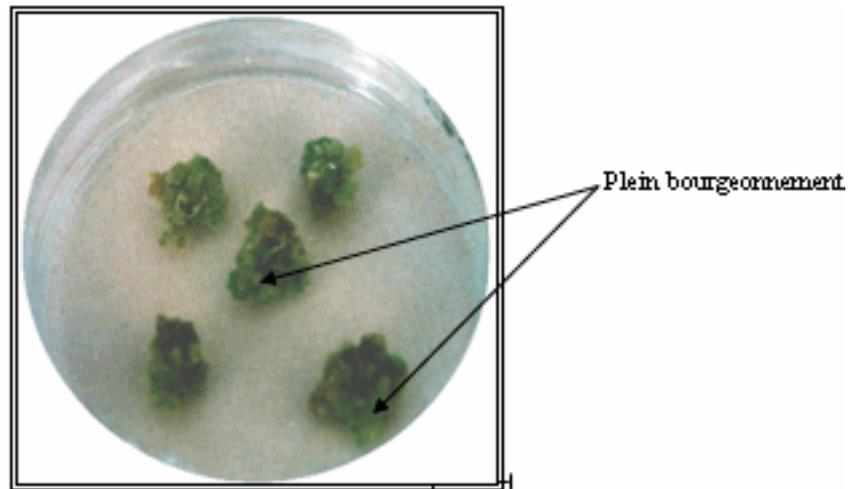


Figure 54: Phase de bourgeonnement

La figure 55 et l'annexe 43 enregistrent les résultats relatifs au taux de croissance et de reprise de la culture des méristèmes de quatre variétés : deux femelles (V_1F_1 : Hayward et V_2F_2 : Monty) et deux mâles (V_3M_1 : Tomuri et V_4M_4 : Matua).

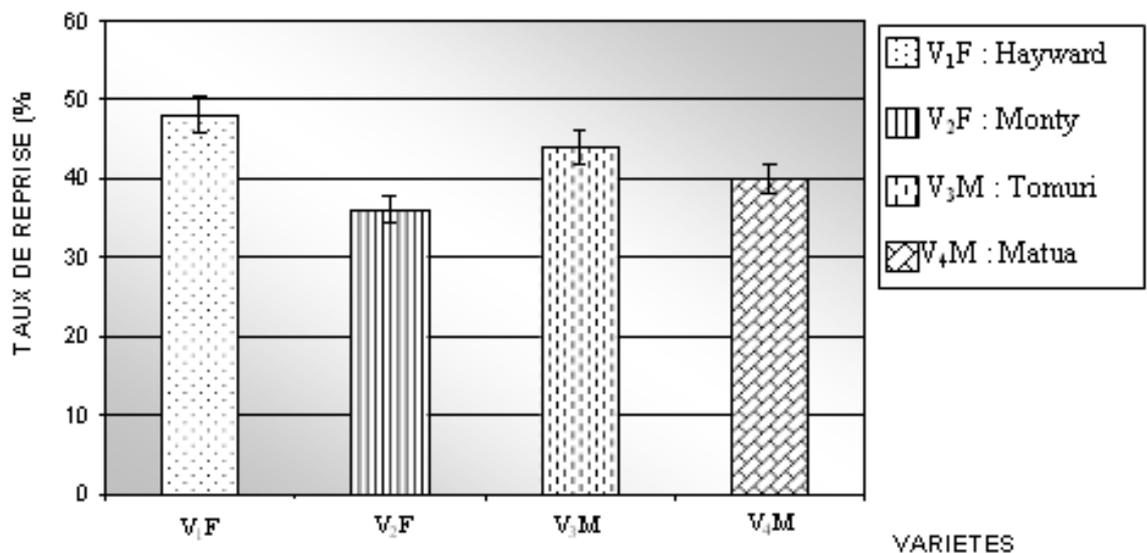


Figure 55 : Comportement des variétés femelles et mâles sur Milieu MS.

La reprise des méristèmes et la vitesse de croissance dans le milieu MS diffèrent d'une variété à une autre :

- La variété Hayward a montré une réaction positive vis-à-vis du milieu MS. Après 22 jours de culture, les méristèmes augmentent de 8 à 9 fois leur volume d'origine.

De nouvelles ébauches foliaires apparaissent et s'organisent en s'imbriquant les unes aux autres pour former une rosette dont le centre est occupé par de jeunes feuilles bien développées (Figure 56).

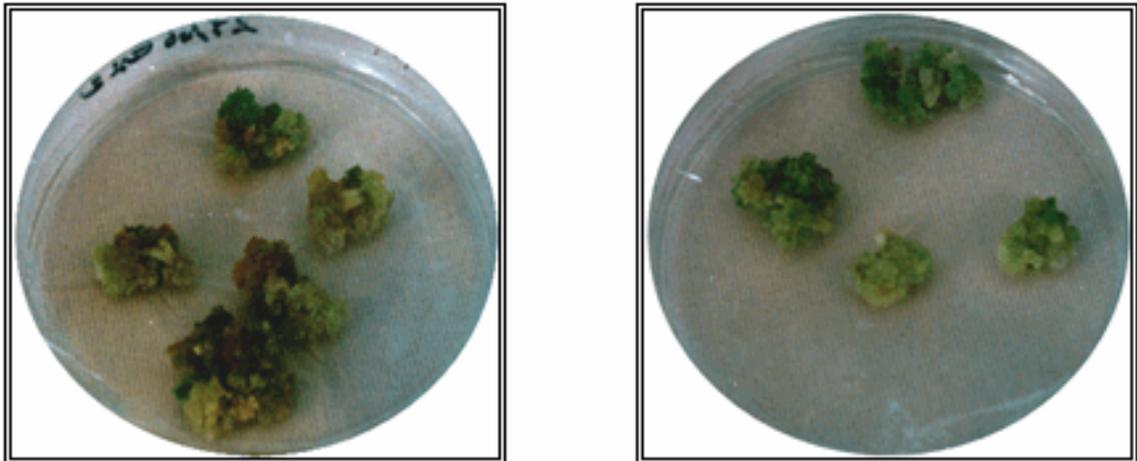


Figure 56: Croissance du méristème en plantule. Cas de la variété Hayward.

- La variété Hayward a pu former quelques radicelles dans le milieu MS
- La variété Monty a réagi elle aussi positivement au milieu MS en produisant de gros méristèmes. Cependant, en comparaison avec la variété Hayward, elle n'a pas développé de radicelles (figure 57).
- Les deux variétés mâles Tomuri et Matua ont eu un développement méristématique plus long, il s'arrête au cours de l'expérimentation.

Quatre semaines après la phase de bourgeonnement, nous avons observé que les 4 variétés montraient des amas méristématiques de diamètres différents.

Ainsi, ces derniers avaient évolué différemment selon la variété considérée (Figure 57 et annexe 43).

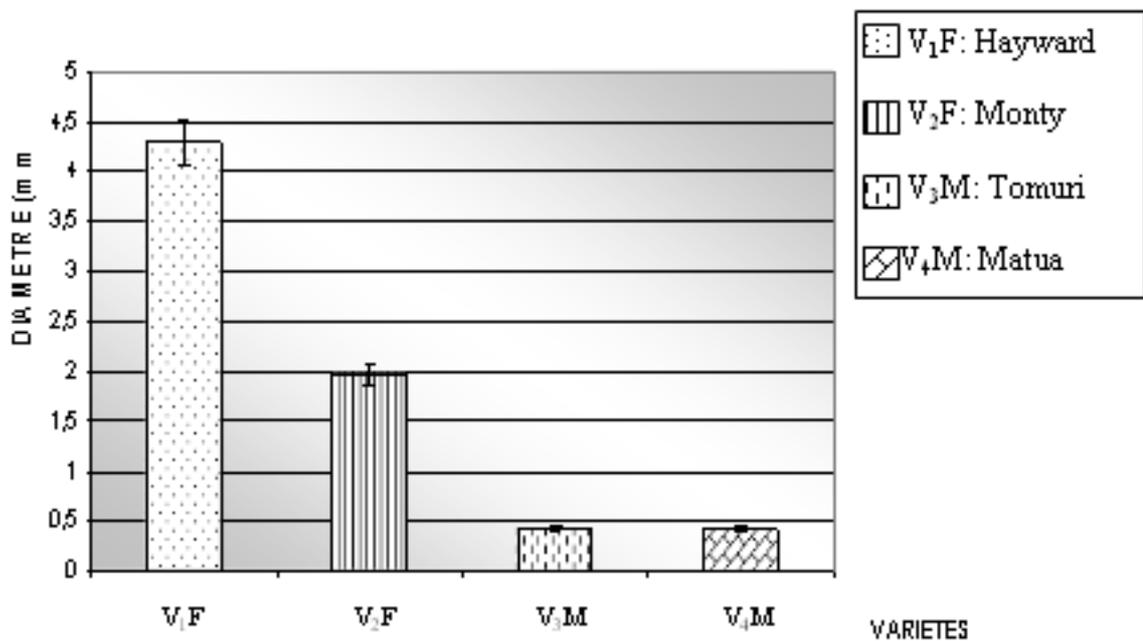


Figure 57: Diamètre des rosettes des jeunes feuilles.

Les résultats (Figure 57) montrent que les rosettes des jeunes feuilles de la variété Hayward sont les plus importantes. En effet, le diamètre moyen est de 4.29 mm ± 0.73mm. Il est suivi par celui de la variété Monty dont le diamètre moyen est de 1.96 mm ± 0.25 mm.

Les rosettes des variétés mâles (Tomuri et Matua) montrent un diamètre moyen très faible. Il est de $0.43 \text{ mm} \pm 0.07 \text{ mm}$. Nous avons remarqué que leur développement s'est arrêté brusquement à l'état de touffe (phase de bourgeonnement) (Figure 58).

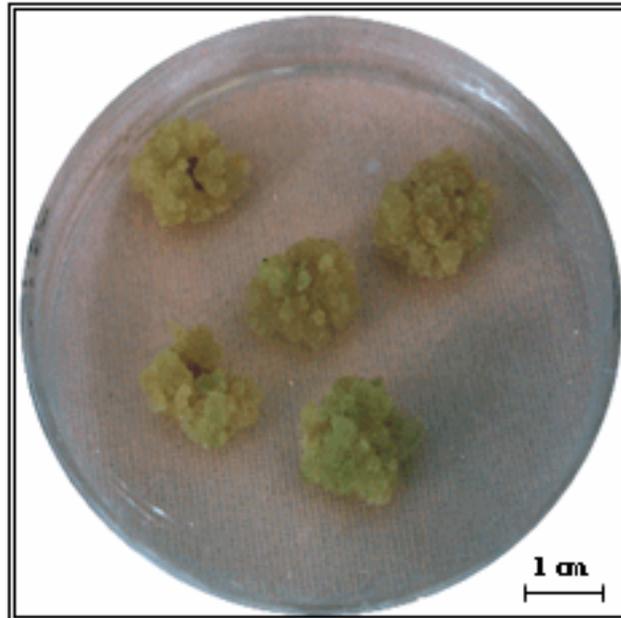


Figure 58 : Cals bruns de la variété Tomuri

1-2-Phase de multiplication et d'allongement

Au premier stade de la caulogénèse, l'apex des pousses feuillées n'était pas visible. Après deux mois d'expérimentation, l'apex est devenu visible sur certaines d'entre-elles. Il est à noter que la plupart des pousses sont sans apex avec des jeunes feuilles étroites et longues à caractère juvéniles.

Le vitro-plant issu après fragmentation du cal présente une ramification très poussée ayant allongement de 20 à 30 mm (Figure 59).

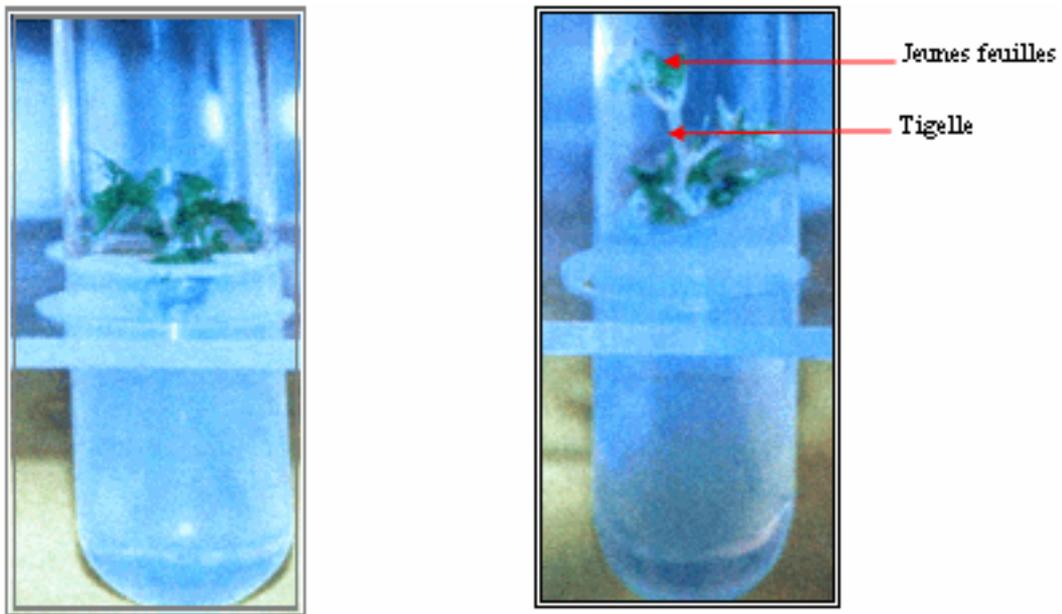


Figure 59: Phase de multiplication et d'allongement.

Le passage sur le milieu d'allongement est une étape indispensable pour l'enracinement des pousses feuillées.

Les critères d'allongement retenus sont le nombre de tigelles par nodule et la longueur de la tigelle (Figure 60). Pour chacune des conditions étudiées 30 explants ont été testés.

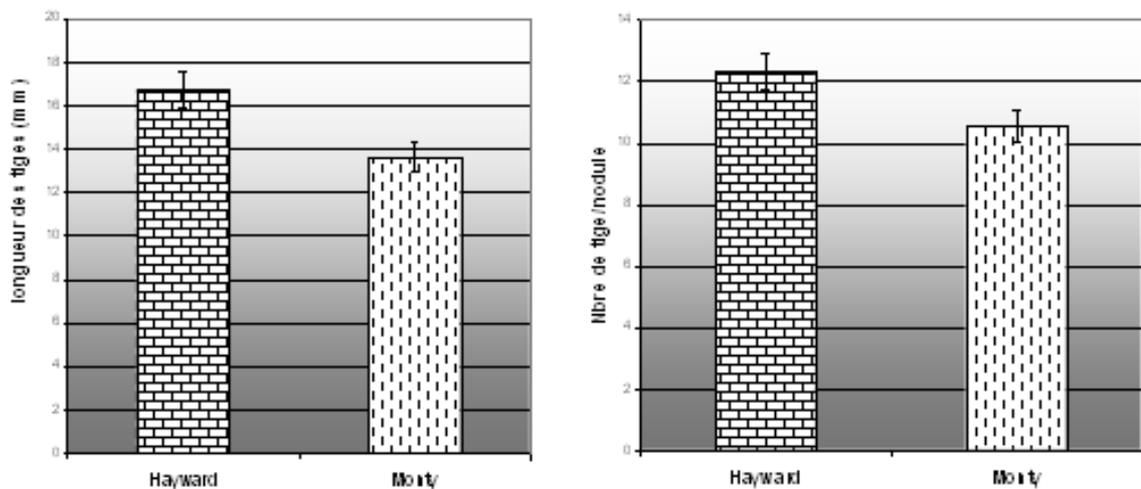


Figure 60 : Influence du milieu MS sur l'allongement des pousses feuillées.

1-3- Phase d'enracinement des pousses feuillées

Le tableau 17 montre les résultats de pousses enracinées des variétés Hayward et Monty, après deux semaines de culture avec trempage au préalable dans une solution hormonale AIB à 50mg/l. L'auxine AIB permet d'améliorer le taux d'enracinement.

	Nombre de pousses feuillées		Pourcentage de tiges enracinées (%)		Nombre moyen de racicules par plantule		Longueur moyenne des racicules (mm)	
	Hay.	Monty	Hay.	Monty	Hay.	Monty	Hay.	Monty
Milieu MS/2 + ANA (0,1 mg/l)	30	30	12.38	10.21	2.3	2.6	3.12	4.01
Trempage dans une solution d' AIB (50 mg/l) — → transfert sur MS/2	30	30	70.65	61.34	7.81	7.38	8.55	7.13

Tableau 18 : Influence de l'AIB et de l'ANA sur l'enracinement des pousses feuillées

Nous remarquons que la méthode de trempage des pousses a donné les meilleurs résultats (Figure 61).

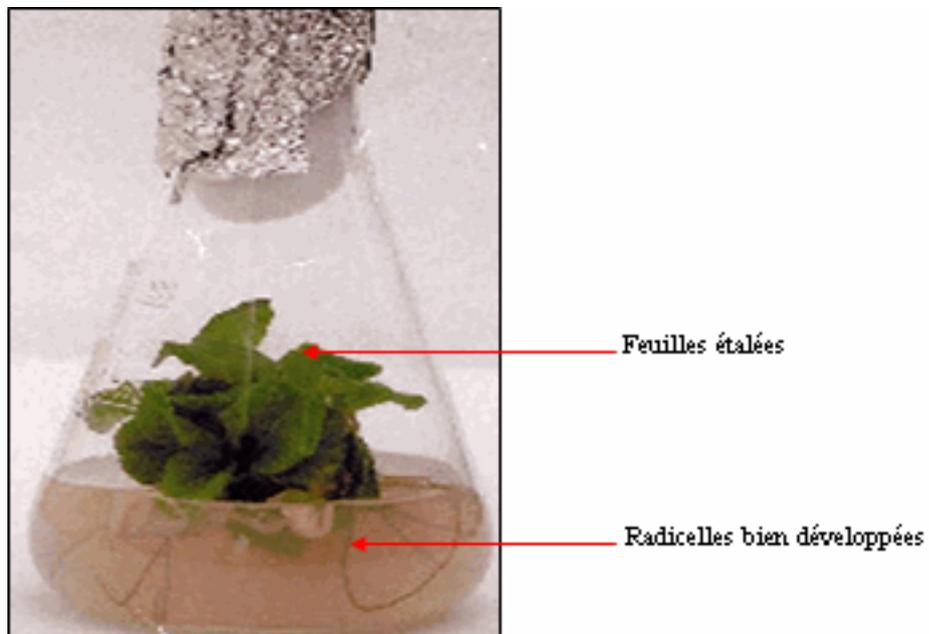


Figure 61: Plantule présentant des racicules sur le milieu de culture MS/2

Soulignons également que les plantules entières dont l'enracinement s'est fait sous l'effet de l'AIB par la technique de trempage sont moins vigoureuses comparées aux plantules obtenues sur le milieu MS/2 additionné de 0.1mg/l d'ANA.

Les deux méthodes utilisées diffèrent par deux paramètres qui sont, le type d'auxine et son apport ou non dans le milieu de culture. Elles ne sont donc pas directement comparables. Néanmoins les résultats obtenus montrent que la technique de trempage est plus efficace.

DISCUSSION

Nous pouvons conclure que le milieu de Barlass (BARLASS et al., 1982) est favorable à la prolifération des cellules du dôme méristématique.

L'évolution du diamètre des rosettes a permis de classer les variétés en deux groupes distincts selon le test de Newman et Keuls 1962 in DAGNELIE, 1980.

- Un groupe comportant les variétés femelles (Hayward et Monty) avec un diamètre moyen des rosettes important. Il est de $4.29 \text{ mm} \pm 0.73 \text{ mm}$ pour la variété Hayward et de $1.96 \text{ mm} \pm 0.25 \text{ mm}$ pour la variété Monty.
- Un deuxième groupe ayant un diamètre moyen très faible. Il est de $0.43 \text{ mm} \pm 0.07 \text{ mm}$, il concerne les deux variétés mâles.

Cette différence entre les quatre variétés est probablement due à la taille des méristèmes prélevés. En effet, selon Lovisolo (1993) plus la taille du méristème est grande au moment du prélèvement et moins le développement est assuré.

En ce qui concerne l'enracinement des pousses feuillées, la technique du trempage rapide dans l'AIB (50 mg/l), pour l'induction et un transfert dans le milieu MS/2 pour l'allongement, a assuré le meilleur rendement.

Les plantules obtenues (pousses feuillées et enracinées) ont été acclimatées sous serre.

Le taux de reprise est de 80 % pour la variété Hayward, en effet, sur un total de 25 plantules à acclimater, 20 ont repris. Concernant la variété Monty, sur un total de 21 plantules à acclimater, 15 plantules ont repris. Ces résultats concernent les deux méthodes confondues à savoir :

- Induction et allongement dans un milieu MS/2 additionné de l'ANA à 0.1 mg/l
- Induction dans un trempage dans une solution stimulatrice de racelles l'AIB à 50 mg/l puis transfert dans le milieu MS/2 pour l'allongement.

Notons que les variétés mâles ont stoppé leur développement au moment du bourgeonnement.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Les différents essais réalisés sur les facteurs de régénération et les techniques de la micropropagation de l'*Actinidia chinensis* PL. ont contribué à la connaissance d'un certain nombre de faits nouveaux :

Les explants prélevés à partir d'un végétal jeune (vitro-semis) sont plus aptes à l'organogenèse et à la callogenèse en comparaison avec les explants prélevés du végétal adulte planté dans un verger.

Les segments du végétal ne réagissent pas de la même manière. En effet, les entrenœuds présentent une meilleure aptitude à la callogenèse, alors que, les disques foliaires présentent une meilleure aptitude à l'organogenèse.

L'auxine 2.4-D est la plus favorable à l'induction de la callogenèse.

La balance hormonale AIA/BAP à une concentration de 0.5 mg/l d'AIA et de 2 mg/l de BAP, est celle qui a permis un meilleur développement des pousses feuillées.

L'acide gibbérellique (AG₃) aux concentrations testées s'est avéré inefficace pour l'allongement des pousses feuillées. Les explants des jeunes feuilles qui évoluent sur un milieu témoin, sans AG₃ montre un allongement qui peut être important. Il est de 2.35 cm ± 0.07 cm. Concernant les pétioles, il est de 2.55 cm ± 0.07 cm.

Les segments de disques foliaires repiqués sur un milieu additionné de 0.5 mg/l d'AIA n'ont pas montré de racines néoformées.

Aucune réponse à la rhizogenèse n'a pu être observée sur les autres types d'explants.

Le potentiel de multiplication par bourgeonnement axillaire des extrémités apicales en l'absence de cytokinines semble assez important. Il permet d'obtenir des rameaux de très haute qualité qui s'enracinent aisément.

D'autre part, parmi toutes les cytokinines testées, seule la BAP semble être l'hormone la plus efficace pour stimuler la ramification axillaire.

Afin de rendre le protocole de micropropagation le plus efficient possible, il serait nécessaire de remédier à la vitrification. Elle conduit à obtenir une plantule de taille réduite et à un faible taux d'enracinement des rameaux axillaires.

Les résultats de l'embryogenèse somatique nous ont permis d'avoir des amas méristématiques délimités. Ils sont localisés au sein des cals issus de disques foliaires d'*Actinidia chinensis* PL. et produits sur un milieu d'induction contenant du 2.4-D (4.5 µM) et de la kinétine (4.65 µM).

Une ébauche du potentiel embryogène de ces amas a pu être révélée. Ce fait nouveau permet de démontrer l'existence et la possibilité à le reproduire.

Ceci nous oriente vers une nouvelle stratégie expérimentale visant à promouvoir l'expression de ce potentiel embryogène.

Les structures formées d'amas méristématiques observées sur milieu solide dépourvu d'hormone induit la différenciation puis le développement de plantules feuillées.

Celles-ci s'enracinent facilement après trempage rapide dans une solution auxinique.

Ce système de multiplication du méristème peut avoir d'importantes perspectives pour la différenciation des variétés d'*Actinidia chinensis* PL. difficile à multiplier.

Les pousses feuillées et enracinées des variétés femelles acclimatées sous serre ont enregistré un taux de réussite élevé. Il est de l'ordre de 80 % pour la variété Hayward.

Perspectives

Le genre *Actinidia* présente de grandes variations au niveau de la ploïdie qui le rend difficile à étudier.

La deuxième difficulté génétique liée au genre se situe au niveau du mode de reproduction, toutes les plantes du genre *Actinidia* sont dioïques. Il est impossible de distinguer les plants mâles des plants femelles d'un point de vue cytologique ou morphologique avant le stade de la maturité reproductive qui a lieu 4 à 6 ans après le semis.

Quant un programme d'amélioration de l'*Actinidia* est mis en place, pour mener le semis à maturité, il est nécessaire d'éliminer les pieds mâles qui représentent un coût d'entretien considérable. Ils constituent généralement 50 % de la population.

Pour les sélectionneurs, l'élimination précoce des mâles serait un gain de temps et de place, ainsi qu'une économie financière appréciable.

L'utilisation d'un test de sexage au stade vitroplant permet d'identifier et d'éliminer les mâles en surnombre.

Ce travail préliminaire nous oriente à développer nos recherches et à utiliser des marqueurs moléculaires dans l'étude de l'*Actinidia*.

Au cours de notre travail, nous avons obtenu des cals hautement embryogènes. L'utilisation des marqueurs quant à l'aptitude embryogène serait éventuellement une voie qui apporterait des solutions à la culture de l'*Actinidia*.

Il serait intéressant de comparer les coûts de cette technique au coût d'élevage de plants mâles jusqu'au stade reproductif.

Cette étude qui est en cours de réalisation, pourrait mettre en évidence l'utilité de la biologie moléculaire dans le domaine de la régénération de l'*Actinidia*.

Ce travail de recherche, à long terme permettra l'intégration de l'ensemble des méthodes étudiées dans les programmes de diversification variétale de l'espèce *Actinidia*.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ABDULHUSSAIN K.H. et ABDULHUSSAIN M.S. 2004.** - Influence of the gibberelic acid on the germination of the seeds of olive tree *Olea europea*. J. of central European agriculture. 5: 1-4.
- AGOSTINI D. 1995.** - La floraison du Kiwi (*Actinidia deliciosa*) : analyse de la variabilité et simulation par un model stochastique. Th. de Doctorat, Université Cl. Bernard. Lyon I. 231P.
- AINSWORTH C. 2000.** – Boys and girls come out to play: the molecular biology of dioecious plants. Ann. of botany (86): 211-221.
- AITKEN-CHRISTIE J. SINGH A.P. DAVIES H. 1988.** - Genetic manipulation of woody plants. Plenum Press. New-York. 413- 432.
- ALEXANDRO K.S. et CONGER B.V. 2002.** - Isolation of tow somatic embryogenesis related genes from *Dactylis glomerata* Plant. Sci. (162) : 301-307.
- ANGIBOUST A. 1981.** - L'Actinidia : un fruit qui retient fortement l'attention des arboriculteurs. Rev. Arbo. Fruit. (328): 29- 33.
- BARLASS M. SENE G.M. WOODHAM RC. et KRABE L.R. 1982.** - Regeneration of virus free grapevines using in vitro apical culture. Ed. Annals of Applied Biology (101): 291-295.
- BARNA K.S. et WAKHLU A.K. 1995.** - Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from immature leaflets in chickpea. *In Vitro Cell. Dev. Bio. Plant.* 31: 130- 142.
- BATCH E.P.M. REYES M.E. AMADOR E.V. RANGEL E.M. RUIZ L.D. et VIRAMONTES H.J. 1998.** - Micropropagation of 21 species of Mexican cacti by axillary proliferation. *In Vitro Cell. Dev. Bio. Plant.* (34): 128- 130.
- BERUTO M. CURIR P. et DEBERGH P. 1996.** - Callus growth and somatic embryogenesis in thalamus tissue of *Ranunculus asiaticus* L. cultivated in-vitro: cytokinin effect and phenol metabolism in vitro *Cell. Dev. Biol. Plant.* (32): 154-160.
- BINDING H. 1985.** - Plant protoplast. Ed. Boca Raton: CRC Press. 21- 37.
- BLANCHET P. 1995.** - Nouvelle variété de Kiwi précoce Montcap. Rev. Arbo. Fruit. (486) : 12- 16.
- BLONDEL L. et BALASTRIERI L. 1964.** - Méthode d'analyse et détermination de la maturité. *Compte Rendu Acad. Agri.* 6P.
- BOCCON G. 1999.** - la culture in vitro appliquée à la multiplication végétative. Dept. de Sc. Biol. Angers. Paris. (20p).
- BOUBEKEUR R. 1996.** - Transmission of cytoplasmic genomes and molecular phylogeny in Actinidia. Th. Ecole doctorale Sci. bio. Sect. vég. 109 P.
- BOXUS P. DEBERGH P. et KRABE L.R. 1995.** - Multiplication végétative. *Biotech Veg.* Ed. Belgique 37-164.

- BREECKMANN F. et MILLET A. 1998.** – Les graines. La Recherche. (309) : 74-77.
- BRHADDA N. ABOUSALIM A. ELMACANE D. et WALALI L. 2003.** - Effet du milieu de culture sur le microbouturage de l'olivier (*Olea europea* L) cv. Picholine Marocaine. Biotech. Agro. Soc. Environ. (7) 3-4 : 177-182.
- BROWN D.C. FINSTAD K.I. et WATSON E.M. 1995.** - Somatic embryogenesis in herbaceous dicots. In Thorpe *In vitro* embryogenesis in plants. Kluwer Academic Publishers Dordrecht. 345:415.
- CHALAK I. 1996.** - Haploïdiploïdisation et cultures cellulaires chez le kiwi : *Actinidia deliciosa*. Caractérisation préliminaire des matériels obtenus. Publications 95 SRA Centre INRA de Corse. 1-2.
- CHALUPA V. 1987.** - Effect of benzylaminopurine and thidiazuron on in vitro shoot proliferation of *Tilia cordata* Mill., *Sorbus aucuparia* L. and *Robinia pseudoacacia* L. *Biologia plantarum* (Praha). 29(6): 422- 425.
- CHAOUIA C. 1998.** - Etude des caractéristiques agro- biologiques de trois cultivars d'*Actinidia* : *Actinidia chinensis* PL. nouvellement introduits en Algérie. Th. Magister INA El Harrach. 180P.
- CHAOUIA C. SNOUSSI S.A. CASSAGNES P. SAIDI F. et GHEZALI H. 2007a.** - Evolution des acides organiques dans les fruits de l'*Actinidia chinensis*. Comm. présentée au 1^{er} Séminaire International sur les Biotechnologies Animales et Végétales le 4-5 nov. 8P.
- CHAOUIA C., SAIDI F. SNOUSSI S.A. GHEZALI H. BENREBIHA F. ABDULHUSSAIN M.S. et BOUCHENAK F. - 2007b** Régénération de l'*Actinidia chinensis* à partir de disques foliaires. *Bull. USAMV* (63) : 275-310.
- CHAOUIA C. 2007** Potentiel de bourgeonnement axillaire de l'*Actinidia chinensis* PL. *Bull. USAMV* (63) : 275-310.
- CHAOUIA C. 2008.** - Indirect somatic embryogenesis of *Actinidia chinensis* PL. A femal Hayward variety case. *Rev. Agriculturae USAMV Cluj Napoca*. 8P.
- CHARBONNIER M. CHUPEAU Y. DESHYES A. DORE C. GOACOLOU J. JOLY P. PERDRIZET E. PRADET A. ROUSSET M. et SANTEGES V. 1988.** - Les biotechnologies au service de la production végétale. Dossier de l'IN. 44P.
- CHAT J. JAUREGUI B. PETIT J. et NADOT S. 2004.** - Reticulate evolution in kiwi fruit (*Actinidia*, Actinidiaceae) comparing their materna land paternal phylogenies. *Am. J. Bot.* (91): 736-747.
- CHAUSSAT R. et BIGOT C. 1980.** - Multiplication végétative des plantes supérieures. *Les cahiers de CREAD* (718): 115-129.
- CHOFFE K.I., VICTOR J.M.R., MURSH S.J. et SAXENA P.K. 2000.** - In vitro regeneration of *Echinacea purpurea* L.: Direct somatic embryogenesis and indirect shoot organogenesis in petiole culture. *In Vitro. Cell. Dev. Bio. Plant.* 36: 30-36.
- CHOI Y.E. YANG D.C., YOON E.S. et CHOI K.T. 1999.** – High-efficiency plant production via direct somatic single embryogenesis preplasmolysed cotyledons of *Panax ginseng* and possible dormancy of somatic embryos. *Plant. Cell. Rep.* 18 (6): 439-499.

- CHOUKRI S. 1998.** - A kiwifruit (*Actinidia sp.*) linkage map based on microsatellites and integrated with AFLP markers ; theor appl. Genet. (103): 30- 36.
- CORBANOV P. 1998.** - Somatic embryogenesis of grapevine and use for *Agrobacterium mediateol* genetic transformation to produce plants resistant to grapevine fauleaf virus (GFLV), agent of the "Court-noue" disease. Th. nouveau Doctorat. Université de Strabourg, France. 145 P.
- DAGNELIE P. 1980.** – Théorie et méthodes statistiques II. Applications agronomiques. Gembloux, Belgique : Les Presses agronomiques de Gembloux. 463P.
- DECAI C. - MYERS J.R., COLLINS G.B. et LAZZERI P.A. 1998.** - In vitro regeneration in Trifolium. 1. Direct somatic embryogenesis in *T. rubens* L. Plant. Cell. Tiss. Org. Cult. 15: 33-45.
- DEMARLY Y. et SIBI M. 1996.** - Amélioration des plantes et biotechnologie. Ed. John Libbey Eurotest, France. 151 P.
- DERAVEL D'ESCLAPON G. 1982.** - Actinidia (Kiwi) Techniques agricoles. Rev. Arbo. Fruit. (7): 1- 10.
- DESAMERO N.V., RHODES B.B., DECOTEAU D.R. et BRIDGES W.C. 1994.** - Picolinic acid-induced direct somatic embryogenesis in sweet-potato. Plant. Cell. Tiss. Org. Cult. 37 (2): 103-111.
- DUCREUX G., ROSSIGNOL L. et ROSSIGNOL M. 1986.** - La pomme de terre Rev. Rech. (17) 174: 193-203.
- ESPINOZA N. ESTRADA R. TOUAR J. et DODS J.H. 1986.** - Culture de tissus : micropropagation, conservation et exportation du germoplasme de la pomme de terre : *Solanum tuberosum*, Ed. CIP guide 1. 19P.
- ETIENNE H. SOTTA B. MOWTORO P. MIGINIAC E. et CARRON M.P. 1998.** - Régulateurs de croissance en embryogenèse somatique. Cahiers d'agriculture : (7) 468-475.
- FAVRE J.M. 1977.** - La rhizogenèse. Aspects divers d'un processus d'organogenèse végétale. Univ. Paris- Sud. 37- 52.
- FELLMAN C.D. READ P.E. et HOSIER M.A. 1987.** - Effects of thidiazuron and CPPU on meristem formation and short proliferation. Hort. Science. 22 (6): 1190- 1220.
- FERAUD-KELLER C. et ESPAGNAC H. 1988.** - Conditions d'apparition d'une embryogenèse somatique sur des cals issus de la culture des tissus foliaires du chêne vert (*Quercus ilex*). Can. J. Bot. (67): 1066- 1070.
- FERGUSON A.R. 1983.** – Etude in vitro du rajeunissement préalable à la micropropagation chez le *Sequoia sempervirens* : Recherche de marqueurs morphologiques, physiologiques et biochimiques. Th. Univ. Paris 6. 309P.
- FERGUSON A.R. 1984.** - Kiwi fruit. Abotanical Horticultural Review (6): 1-60.
- FERGUSON A.R., O'BRIEN I.E.W. et YAN G.J. 1997.** - Ploidy in Actinidia. Acta Horticulturae. 444 (1): 67- 71.
- FLEGMANN A.V. et WAINWRIGHT H. 1981.** - Shoot doubling time: a qualitative parameter for characterizing shoot cultures. *In Vitro*. Plant. Cell, Tiss, Org, Cult. (1): 80- 90.

- FOURNIER J.M. 1976.** - L'*Actinidia chinensis* : Le Kiwi on Yang Tao. Th. de fin d'étude E.S.A.P Toulouse. 778 P.
- FOURNIER J.M. 1977a.** - L'*Actinidia chinensis* et sa culture (première partie). Rev. Pomol. Française. (19) 2 : 23- 31.
- FOURNIER J.M. 1977b.** - L'*Actinidia chinensis* et sa culture (deuxième partie). Rev. Pomol. Française. (19) 2 : 34- 36.
- FOURNIOUX J.C. GRENANS S. et KINDT S. 1998.** – Comportement en serre des variétés de vigne (*Vitis vinifera* L.) issues de microboutures multipliées in vitro selon différentes modalités. Bull. O.I.V. 5-19.
- FOURNIOUX J.C. et LANGILIER P. 2004.** - Endogenous abscissic acid concentrations as a marker of adult and juvenile morphogenesis in grapevine (*Vitis vitifera* L. cv. Pinot noir). *Vitis* (39): 47- 48.
- FRANCLET A. 1981.** - Rajeunissement et micropropagation des ligneux. Proc. Coll. Int. Cult. In vitro. Essences Forestières. IU. FRO. Fontaine bleu, France. AFOCEL. 55-64.
- GAMBORD O. MILLER R. et OJIMA K. 1968.** - Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell. Rep.* (50): 151- 158.
- GAMBORD O. MURASHIGE T. THORPE T. ET VASIL I. 1976.** – Culture in vitro. (12) 7 : 473-478.
- GAUTHRET R.J. 1959.** - La culture des tissus végétaux. Techniques et réalisations. Ed. Masson Paris. 863 P.
- GEORGE E.F. 1993.** - Plant Propagation by tissue culture. Part 1: The technology. Exegetics Ltd, England. 574- 592.
- GEORGE E.F. 1996.** - Plant propagation by tissue culture. Part 2: In practice. Second edition. Exegetics Ltd England. 662- 1260.
- GHORBEL A. CHATIBI A. MILIKI A. KCHOUR M.E. et ZEMNI H. 1994.** - Propagation in-vitro du pêcher amandier GF 557 Quel avenir pour l'amélioration des plantes. Ed. AUPELF-UREF Paris. 263-274.
- GRIBAUDO I. et FRONDA A. 1991.** - Effects of thidiazuron on grapevine axillary buds cultivated in vitro. *Hort. Science.* 26(8): 1080- 1083.
- GRIGA M. 1998.** - Direct somatic embryogenesis from shoot apical meristems of pea, and thidiazuron-induced high conversion rate of somatic embryos. *Biologia Plantarum.* 41 (4): 481-495.
- GUILLAUM N.A. 2001** kiwifruit to improve fruit size. The orchardist of new Zealand. 28-35.
- GUPTA S.D., AHMED R. et DE D.N. 1997.** - Direct somatic embryogenesis and plantlet regeneration from seedling leaves of winged bean, *Psophocarpus tetragonolobus* L. DC. *Plant. Cell. Rep.* 16 (9): 628-631.
- HAICOUR R. 2002.** - Biotechnologie végétale. Techniques de laboratoire. Ed. LAVOISIER. Paris. 327 P.
- HAMMATT N. et DAVEY M.R. 1987.** - Somatic embryogenesis and plant regeneration from cultured zygotic embryos of soybean (*Glycine max* L. Merr.). *J. Plant Physiol.* 128 : 219-226.

- HASSIG B.E. 1989.** - Status of forest tree vegetative regeneration and biotechnology. Am. Biotech. Lab. (7): 48- 51.
- HEMMERLE A. 1977.** - L'actinidia et ses problèmes. Observations effectuées de 1971-1976. Rev. Arbo. Fruit. (275) : 30- 33.
- HENNION B. 2003.** – Monographie : le kiwi. Ed. CTIFL 152 P.
- HUANG L.C. HUANG B.L. et MURASHIGE T. 1998.** - A micropropagation protocol for *Cinnamomum camphora*. In Vitro. Cell. Dev : Plant. (34): 140- 147.
- HUANG T. 2002.** - Plant regeneration from leaf derived callus in *Citrus grandis* (Pumelo); effects of auxins in callus induction medium. Plant Cell. Tissue. Organ. Cult. (65): 141-146.
- HUETTMAN C.A. et PREECE J.E. 1993.** - Thidiazuron : a potent cytokinin for woody plant tissue culture. Plant. Cell. Tiss. Org. Cult. (33) : 100- 110.
- HUGLIN P. 1998.** – Biologie et écologie de la vigne. Ed. Lavoisier. 371P.
- JANSEN W.A. 1962.** - Botanical histochemistry. Principles and practice. W. H. Freeman Company. San Fransisco. 408p.
- JONES O.P. 1991.** - The role of biotechnology in the multiplication and improvement of woody plants. Acta horticulturae. (289): 35- 44.
- KAMADA H. et HARADA H. 1979.** - Studies on the organogenesis in carrot tissue cultures I. Effects of growth regulators on somatic embryogenesis and root formation. Z. pflanzenphysiol. Bd. 91: 255-266.
- KASMICHE E. 1994.** - Recherches sur la micro-propagation et la régénération in-vitro du jojober (*Simmoudsia chinensis* L.). J. Rech. Tunis. 102P.
- KAVATHEKA A.K., GANAPATHY P. et JOHRI B.M. 1978.** - In vitro responses of embryoids of Eschsholzia California. Bot. Plant. (20): 98- 106.
- KUKLIN A.I., DENCHEV P.D., ATANASSOV A.I. et SERAGG A.H.1994.** - Alfalfa embryo production in airlift vessels via direct somatic embryogenesis. Plant Cell. Tiss. Org. Cult. 38 (1): 19-23.
- KUSHALKAR R. et SHARON M. 1996.** - Direct and indirect somatic embryogenesis in teak (*Tectona grandis* L.). Current Science. 71 (9): 712-715.
- LAFON J.P. THARAUD PRAYER C. et LEVY G. 1998.** - Biologie des plantes cultivées. Tome 2. Physiologie de développement génétique et amélioration. 145 P.
- LANG R. JACQUIOT C. et JAMES D.J. 1959.** – Formation d'organes par le tissu cambial de l'*Ulmus campestris* L. et de *Betula verrucosa* G. cultivés in vitro CR Acad. Sci. Paris. (240) :557-558.
- LARUE M. 1975.** – L'Actinidia et sa culture. Rev. Fruit. (3) 1 : 45-50.
- LEBRUN L. 1986.** - Etude de l'embryogenèse somatique in-vitro chez la vigne (*Vitis sp*) et application à la sélection des plantes tolérant de fortes concentrations au chlorure de sodium. Th. de Doctorat en Sc. Nat. Paris XI .173P.
- LEE STADELMANN O.Y., LEE S.W., HACKETT W.P. et READ P.E. 1989.** - The formation of adventitious buds in vitro on micro-cross sections of hybrid *Populus midveins* .Plant Sci. (61) : 263- 272.

- LI B. et WOLYN D.J. 1996.** - Abscisic acid and ancymidol promote conversion of somatic embryos to plantlets and secondary embryogenesis in *Asparagus officinalis* L. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 32: 223-226.
- LI Z. TRAORE A. MAXIMOVA S. et GULTINAN M.J. 1998.** - Somatic embryogenesis and plant regeneration from floral explants of cacao (*Theobroma cacao* L.) using thidiazuron. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 34: 293-299.
- LIANG G. et FERGUSON A.R. 1986.** - The botanical nomenclature of the kiwifruit and *Relatetaxa*. *New-Zealand jour. of Botany.* (24): 183- 184.
- LINASSET P. et CORNUET P. 1949.** – Recherche du virus de la mosaïque du tabac dans les méristèmes de plantes infectées. *C.R.Ac. Sci. Paris.* (228) :1971-1972.
- LOVISOLO P. 1993. - Assainissement des plantes ligneuses. Ed. IAM. 90P.
- MaC COWN B.H. ZELDIN E.L. PINKALLA H.A. et DEDOLPH R.R. 1987.** - Genetic manipulation of woody plants. Ed. New-York : Plenum Press. 149- 166.
- MAHESHWARI S.C. GILL R. MAHESHWARI N. et GHARYAL P.K. 1986.** - Differentiation of protoplasts and transformed plant cells. Ed. Berlin: Springer- verlag. 3- 36.
- MALUEG K.R., Mc-DANIEL G.L., GRAHAM E.T. et TRIGIANO R.N. 1994.** - A 3 media transfer system for direct somatic embryogenesis from leaves of *Senecio x hybridus* HYL (Asteraceae). *Plant. Cell. Tiss. Org. Cult.* 36 (2): 249-253.
- MARGARA J. 1984.** - bases de la multiplication végétative, les méristèmes et l'organogénèse. Ed. INRA Paris. 262P.
- MARGARA J. 1990.** - Bases de la multiplication végétative. Les méristèmes et l'organogénèse. Ed. INRA 230 P.
- MARTIN L. 1984.** - La culture des plantes en éprouvettes. *Rev. La Recherche* (15) 6 :1363-1405.
- MASUDA H. OOHASHI S.L. TOKUJI Y. et MIZUE Y. 1995.** - Direct embryo formation from epidermal cells of *Carrot hypocotyls* J. *Plant. Physio.* 145: 531-534.
- MERKELE S.A. PARROTT W.A. et FLINN B.S. 1995.** - Morphogenic aspects of somatic embryogenesis. Ed. In Thorpe, T.A. *In Vitro embryogenesis in plants.* Kluwer Academic Publishers. Dordrecht. 145- 195.
- MOK M.C. MOK D.W.S. ARMSTRONG D.J. SHUDO K. ISOGAI Y. et OKAMOTO T. 1982.** - Cytokinin activity of N- phenyl- N'- 1, 2, 3- Thiadiazol-5- ylurea (thidiazuron) *Phytochemistry* 21(7): 1450- 1509.
- MONET R. 1976.** - L'Actinidia de Chine. Les limites de sa culture en France. Sa taille et sa multiplication. *Rev. Arbo. Fruit.* (26): 21- 27.
- MOREL G.M. 1960.** - Producing virus- free cymliidiums merican *Orchid society.* Bull. (29) :495-497.
- MOREL G.M. et MARTIN L. 1952.** – Obtention de jeunes plants à partir de boutures cultivées in vitro. *CR. Acad. Sci. Paris.* (272) : 186-192.
- MURASHIGE T. et SKOOG F. 1962.** - A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* (15): 470- 482.

- NANSON R. 2004.** - Somatic proembryo formation and transient expression of a luciferase gene in Douglas fir and loblolly pine protoplasts. *Plant. Sci.* (58): 85-92.
- NIHOUL E.D. 1976.** - Le yang Tao : *Actinidia chinensis* Planchon Rev. Fruit. (31) 2 : 97-104.
- NISCH J.P ET NISCH C. 1965.** – Néof ormation de fleurs in vitro chez une espèce de jours courts : *Plumbaga indica* L. *Ann. Phys. Veg.* (7): 250-262.
- ORTIZ B.O.C. REYES M.E.P et BALCH E.P.M. 2000.** - Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Acacia farnesiana* and *A. schaffneri*. *In Vitro Cell. Dev. Bio.* Plant 36: 268-272.
- PAILLY O. HABIB R. et DELECOLLE R. 1995** Effet of soil and climate conditions on soluble solids evolution during maturation of kiwifruit. Publi. 95 – SRA- Centre INRA de Corse.
- PIERIK R.L.M. 1997.** - In vitro culture of higher plants. *Hort. Science.* (22) : 1071- 1078.
- PREECE J.E. HUETTEMAN C.A. PUELLO C..H. et NEWMAN M.C. 1987.** - The influence of thidiazuron on in vitro culture of woody plants. *Hort. Science.* (22) 1050-1080.
- RAFOLS R. 2000.** – Culture of system explant of Chinese gooseberry in vitro in Research reports for Actinidia. Ed. Zhengzhou Inst. Pomol. CAAS. 225-235.
- RAHN R.S. 1979.** – In vitro organ culture of *Actinidia chinensis* Planchon as a technique for vegetative multiplication. *J. Hort. Sci.* (50): 81-83.
- RAJASEKARAN K. HEIN M.B. DAVIS G.C. CARNES M.G. et VASIL I.K. 1987.** – Endogenous growth regulators in leaves and tissue cultures of *Pennisetum purpureum* Schum. *Jour. Of plant Physiol.* (30) : 13-25.
- ROCCA SERRA D. 1990.** - Programme de génétique et amélioration des actinidiacées à la SRA. B.T.K : 5 INRA France. 1-3.
- ROEST S. et GILISSEN I.J.W. 1989.** - Plant regeneration from protoplastes : a literature review. *Acta Bot. Neerl.* (38) : 1-23.
- ROSSIGNOL L. 1988.** - Regenerazione in vitro de foglie di *Actinidia deliciosa* cultivar Hayward. *Revista di frutticoltura.* (11) : 69-72.
- SAKA H., ABED F., AMARA B. et KERMICHE A. 1997.** - Embryogenèse somatique du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.). Induction de la callogenèse à partir d'organes de rejet de quelques cultivars. Ed. INRA- ALGER. (1) : 1-7.
- SALE P. 1984.** - Kiwifruit establishment factors. *Horticultural produce and practice.* 31-34.
- SCRIBAN R. 1999** Biotechnologies. Ed. LAVOISIER. 200P.
- SERRA R.D. 1990.** - Programme de génétique et amélioration des Actinidiaceae à la SRA. *Rev. BIK. Spécial Recherche.* INRA 25: 1- 40.
- SOYEZ J.L. 1971.** - Complément sur le Yang Tao. *Rev. Arb. Fruit.* (23): 14- 18.
- SUDHERSAN C. ABOU-EL-NIL M.M. et AL-BAIZ A. 1993.** - Occurrence of direct somatic embryogenesis on the sword leaf of in-vitro plantlets of *Phenix dactylifera* L.cultivar barhee. *Current Science.* 65 (11): 887-889.

- SUEISHI M. et TANIMOTO S. 1994.** - Direct embryogenesis in carrot seedlings. Bull. Fac. Agr., Saga Univ. 77: 11-16.
- SUHASINI K. SAGARE A.P. et KRISHNAMURTHY K.V. 1994.** - Direct somatic embryogenesis from mature embryo axes in chickpea (*Cicer arietinum* L) Plant Science. 102 (2): 189-194.
- TETU T. SANGWAN R.S. et SANGWAN-NORREEL B.S. 1987.** - Hormonal control of organogenesis and somatic embryogenesis in *Beta vulgaris* callus . J. Exp. Bot. 38 (188): 502- 515.
- THIS P. 2002.** - Diversité et génomes des plantes cultivées. Rapport d'activité. Ecole Agro. Montpellier, France. 14P.
- TISSERAT B. et MURASHIGE T. 1977.** - Effects of ethephon ethylene, and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on asexual embryogenesis in-vitro Plant Physiol. 60: 437-439.
- TOURTE Y. 2002.** - Génie génétique et biotechnologie. Concepts, méthodes et application agronomique. 2^{ème} ed. Dunod. 241P.
- TRAN THANH VAN K. 1992.** - In vitro organogenesis and somatic embryogenesis. Acta Hort. Propagation of Ornamental Plants. (314):27-35.
- VASSIERE B. TORRE CROSSA J.P. NICOLAS J. AUBERT S. ESCUIDIER T. et RODET G. 1991.** - Pollinisation as a production and quality factor in kiwifruit 1990. Collo. Rech. Fruit. Avignon INRA et CTIFL Paris. 40 – 42.
- VENKATACHALAM P., GEETHA N., KHANDELWAL A., SHAILA M.S. et SITA G.L., 1999.** - Induction of direct somatic embryogenesis and plant regeneration from mature cotyledon explants of *Arachis hypogaea* L. Current Science. 77 (2): 269-273.
- VISESSUWAN R., KAWAI T. et MII M. 1997.** - Plant regeneration systems from leaf segment culture through embryogenic callus formation of *Rosa hybrida* and *R. canina*. Breeding Science. 47: 217-222.
- VITAGLIANO C. et TESTOLIN R. 1983.** - Osservazioni su alcuni fattori influenzanti la rizogenesi di talee legnose e semi- legnose di Actinidia (*Actinidia chinensis* PL.). Comunicazione presentata al II Incontro soi sull'Actinidia Udine 12- 13 oct. 611- 639.
- WALALI L. BRHADDA N. et ABOUSALIM A. 2007.** - Histological study of the somatic embryogenesis of Marocceau Picholine olive tree *Olea europea*. Rev. Fruits. (62) 2: 115-124.
- WARRAG E. LESNEY M.S. et RROCKWOOD D.J. 1991.** - Nodule culture and regeneration of *Eucalyptus grandis*. Hybrids. Plant. Cells. Reports (9) : 586- 589.
- WHITE R. 1934.** – Multiplication of Virus of tov-bacco and aucuba mosaic growing excised tomato roots. Phytopathology. (24) : 1003-1011.
- WILLIAMS E.G. et MAHESHWARAN G. 1986.** - Somatic embryogenesis: Factors influencing co-ordinated behaviour of cells as an embryonic group. Ann. Botany. (57): 440-449.
- XIAO X.G. 1991.** - Micropropagation du kiwi (*Actinidia Sp.*) à partir de disques foliaires cultivés in-vitro. DEA de Biol. Veg. Tropicale. Université Pierre et Marie Curie. Paris. 120 P.

- XIAO X.G. HIRSH A.M. et FORTUNE D. 1991.** - Régénération du kiwi (*Actinidia chinensis*) cultivar Hayward à partir de jeunes feuilles. Rev. Fruits (46) 1 : 57-60.
- XIAO X.G. HIRSH A.M. et FORTUNE D. 1991.** – Régénération du kiwi (*Actinidia chinensis* PL.) cultivar Hayward à partir de jeunes feuilles. Rev ; Fruits (46) 1 :57-60.
- XU Z.Q. JIA J.F. et HU Z.D. 1997.** - Somatic embryogenesis in *Sesamum indicum* L. cv nigrum J. Plant. Physiol. 150: 755-758.
- YACOUB-BOUGDAL S. SEMADI A. HAMLAT M. LOUERGUIOUI A. et BONALY J. 2000.** – Rhizogenèse des microboutures de l'olivier *Olea europea* L. var. Chemlal. Sc. Et Tech. (14) : 129-133.
- YEUNG E.C. 1995.** - Structural and developmental patterns in somatic embryogenesis in Thorpe T.A. ed in vitro embryogenesis. TA. Ed. *In Vitro* embryogenesis in plants. Kluwer, Academic. Publishers, Dordrecht. 205-247.
- ZRYD T.P. 1988.** - La culture des méristèmes, des cellules, tissus et organes végétaux. Ed. Press. Poly. Rom Lausanne Suisse. 305P.
- ZRYD T.P. WAKHLU A.K. et SHARMA R.K. 1988.** – Micropropagation of *Heracleum candicans* WALL : a rare medicinal herb. *In Vitro* Cell. Dev. Biol. Plant. (35): 79-81.

ANNEXES

Annexe 1 : VARIETES FEMELLES D'ACTINIDIA

1. Hayward

Variété créée en Nouvelle- Zélande par Hayward R. Wright en 1920, et commercialisée et distribuée à Auckland depuis 1930 (FERGUSON, 1983).

- **Arbre** : Vigueur moyenne, production moyenne à fruits tardifs ; ces caractères sont compensés par les qualités du fruit, qui offrent de plus grandes perspectives de commercialisation.
- **Feuilles** : généralement de forme circulaire à l'apex saillant et rarement tronqué. Rayon de 75 mm ayant un pétiole de 5.9 cm en moyenne.
- **Fleurs**: solitaires, très rarement en groupes de deux ou trois, de couleur blanc-crème, ayant un diamètre de 5 à 6 cm. La longueur du pédoncule varie entre 45 et 55 mm. Les pétales sont ronds ou elliptiques, leur onglet a des nuances vertes à jaunâtres.
- **Fruits** : Ils sont de grande taille, uniformes. Le poids moyen est de 90 à 95 g. Le fruit présente une section longitudinale elliptique et ovale, et de section transversale ovale. La peau est de couleur brun-rougeâtre avec des reflets tirant sur le vert. Elle est couverte de poiles fins, doux et soyeux. Les dimensions moyennes sont : longueur 66 mm, circonférence 158 mm La longueur du pédoncule est de l'ordre de 46 mm.
- **Pulpe** : Elle est verte et brillante, fondante et moyennement juteuse. Sa saveur maintient un équilibre idéal en sucres et en acides, avec un arôme agréable.
- **Floraison** : Elle est tardive, elle commence quelques jours après celle de la variété Abbott et s'échelonne sur dix jours.
- **Récolte** : Première quinzaine de novembre.
- **Conservation** : Très bonne, à température ambiante. Le fruit peut se conserver dans une chambre froide pendant environ 180 jours. Il est très résistant à la manutention et aux transports.
- **Caractéristiques agronomiques** : la variété Hayward est une variété sensible aux nématodes, à la chlorose ferrique et à la sécheresse estivale. Elle est très exigeante quant aux conditions édapho-climatiques. La plante entre en production à partir de la troisième ou quatrième année, si elle est vigoureuse. Indice de fertilité est de 4 fruits par branche.

2. Monty

Variété également obtenue en Nouvelle- Zélande par Bruno H. Just, et introduite dans le commerce en 1957 (FERGUSON, 1983).

- **Arbre** : Il est très vigoureux et très productif, tendant souvent à se surcharger de fruits. Le bois surtout les sarments de l'année, présentent une couleur plus claire que celui des autres variétés.
- **Feuilles** : Elles sont généralement de forme arrondie avec un apex saillant ou tronqué. Son rayon est de 80 mm. Le pétiole mesure environ 52 mm en moyenne.

- **Fleurs:** Elles sont de couleur blanc crème, d'un diamètre de 50 à 60 mm. Le pédoncule mesure de 30 à 40 mm. Elles sont généralement regroupées en inflorescences de deux ou trois, et se présentent plus rarement seules. Les pétales sont de forme ronde ou elliptique avec un onglet aux nuances vertes et jaunes.
- **Fruit :** Il est de petite taille, d'un poids moyen de 35 à 40 g, Sa coupe longitudinale est allongée légèrement piriforme, sa coupe transversale est ovoïde ou ronde. La peau est de couleur marron claire couverte de poils denses et doux. Les dimensions moyennes du fruit : longueur 64 mm, circonférence 138 mm. La longueur du pédoncule est de 31 mm.
- **Pulpe :** Elle est de couleur verte, translucide, moyennement juteuse. Elle est plus sucrée que les autres variétés et finement parfumée.
- **Floraison :** Elle coïncide avec celle de la variété Abbott.
- **Récolte :** Début du mois novembre.
- **Conservation :** Elle n'est pas très bonne. Le fruit ne supporte pas les manipulations.
- **Caractéristiques agronomiques :** La variété est plus résistante que la variété Hayward aux nématodes, à l'aridité estivale et aux terrains calcaires. Elle est intéressante pour sa grande productivité avec un indice de fertilité de 9. Cette variété rend l'éclaircissage indispensable des fruits pour l'obtention d'un calibre qui soit commercialisable. Elle produit à partir de la troisième année de plantation.

3. Abbott

Variété obtenue en Nouvelle- Zélande à partir de la sélection et de l'amélioration des variétés originaires de Chine. Elle est commercialisée depuis 1930 (FERGUSON, 1983).

- **Arbre :** Il est vigoureux, productif, et à floraison précoce.
- **Feuilles :** généralement rondes ou oblongues, à l'apex mucroné ou légèrement tronqué. La feuille présente un rayon de 75 mm. Le pétiole a une longueur d'environ de 65 mm.
- **Fleurs:** Elles sont de couleur blanche-crème. Elles sont grandes de diamètre de 55 à 65 mm. Le pédoncule est très long de 50 à 70 mm. Les fleurs sont généralement regroupées par deux ou par trois et rarement isolées. Les pétales sont de forme ronde ou elliptique, au bord légèrement ondulée, et leur onglet est taché de rouge violacé.
- **Fruits :** Les fruits sont de taille moyenne, d'un poids moyen de 65 à 75 g, de forme elliptique et allongée en coupe longitudinale, et de section transversale ronde. Sa peau est brunâtre et couverte de poils drus et plus longs que chez la variété Bruno. Ses dimensions moyennes: longueur 66 mm, circonférence 133 mm ; la longueur du pédoncule est de 55 mm.
- **Pulpe :** Elle est fondante, de couleur verte, tirant sur le jaune paille brillant. Elle a une saveur douce, acidulée et agréablement parfumée, moyennement juteuse. Globalement, cette variété présente de bonnes caractéristiques gustatives.
- **Floraison :** Elle commence à la deuxième quinzaine de mai. Tous les arbres sont entièrement fleuris à la fin de ce même mois.
- **Récolte :** Fin du mois d'octobre.
- **Conservation :** Elle est moyenne, environ 60 jours en chambre froide.
- **Caractéristiques agronomiques :** Cette variété est intéressante pour sa productivité et la qualité de ses fruits. Elle s'adapte généralement bien à différents environnements.

Elle est sensible à la chlorose, aux nématodes, à la sécheresse, au vent, aux faibles niveaux hygrométriques de l'air et aux déséquilibres hydriques en général qui provoquent des nécroses foliaires et de la rouille sur les fruits.

Elle produit à partir de la troisième ou quatrième année de la plantation si les plants sont vigoureux.

Indice de fertilité : 4 fruits par branche.

4. Allison

Créée en Nouvelle- Zélande par Bruno H. Just, elle distribuée depuis 1930 (FERGUSON,1983).

- **Arbre** : Il est très vigoureux, productif.
- **Fleurs** : Les pétales sont plus larges, superposés et à bords recourbés, ce qui les différencie de la variété Abbott. Elles se présentent souvent par deux, rarement seules.
- **Fruits** : Ils sont de taille moyenne mais légèrement plus grand et plus large que celui de la variété Abbott.

La peau est brunâtre et la pilosité est dense.

- **Pulpe** : Elle est de couleur verte translucide, avec de bonnes caractéristiques gustatives.
- **Floraison** : Elle est légèrement moins précoce que la variété Abbott.
- **Caractéristiques agronomiques** : Cette variété n'est pas très répandue, bien que certains auteurs la considèrent comme faisant partie de la variété Abbott parce qu'elle lui ressemble.

5. Bruno

Variété obtenue à Palmerson North (Nouvelle- Zélande) par Bruno H. Just en 1920 par sélection et amélioration des variétés originaires de Chine. Elle est commercialisée depuis 1930 (FERGUSON, 1983).

- **Arbre** : Il est très vigoureux et productif.
- **Feuilles** : Elles sont généralement de forme circulaire ou oblongue, leur extrémité est saillante ou bien légèrement tronquée. La feuille a un rayon de 75 mm et un pétiole de 52 mm de long en moyenne.
- **Fleurs** : Elles sont de couleur blanche-crème. Le diamètre est de 45 à 55 mm. Le pédoncule mesure 30 à 40 mm. Généralement, elles se présentent seules ou groupées par deux ou par trois. Les pétales sont elliptiques ou ronds, avec des nuances rouges violacés sur l'onglet. Les styles sont descendants.
- **Fruits** : Ils sont de taille moyenne, d'un poids moyen de 60 à 70 g, de section longitudinale elliptique et très nettement cylindrique, de section transversale ronde. La peau est brune à rose foncé, couverte de poils sombres, épais, courts et rêches.

Les dimensions moyennes du fruit sont : longueur 71 mm, circonférence 12 mm. La longueur du pédoncule est de 32 mm.

- **Pulpe** : Elle est de couleur verte, tirant sur le jaune paille brillant. La pulpe est juteuse et fondante.

Saveur agréablement acidulée, légèrement sucré et finement parfumée.

- **Floraison** : elle commence après la floraison de la variété Abbott et s'échelonne sur 10 jours.
- **Récolte** : Fin octobre début novembre.
- **Conservation** : Elle est moyenne en fruitier, bonne en chambre froide pouvant atteindre environ 70 jours.
- **Caractéristiques agronomiques** : C'est une variété reconnaissable à sa végétation présentant une couleur verte intense.

Elle est sensible à la chlorose, aux nématodes, à la sécheresse estivale.

Elle produit des fruits après trois ou quatre ans si les plantes sont vigoureuses. Indice de fertilité : 5.5 fruits par branche.

Annexe 2 : VARIETES MÂLES D'ACTINIDIA

1. Tomuri

- **Arbre** : Vigoureux, dont la floraison est intermédiaire par rapport aux variétés femelles, mais qui dure assez longtemps.
- **Fleurs** : Elles sont plus grandes que celles de la variété précédente et regroupées par cinq, et parfois il existe des groupes de sept fleurs. Les poils des pédoncules sont très longs.
- **Caractéristiques agronomiques** : Cette variété est indiquée pour la pollinisation des variétés tardives comme la variété Hayward.

2. Matua

- **Arbre** : Vigoureux, très prolifère, à floraison abondante et précoce qui dure assez longtemps.
- **Fleurs** : Elles sont regroupées en nombre variable de un à cinq, mais généralement groupées par trois. Les pédoncules sont à poils courts.
- **Caractéristiques agronomiques** : La floraison de Matua couvre celle de presque toutes les variétés femelles, mais elle est bien plus précoce que celle de la variété Hayward.

3. M-3

- **Fleurs** : Elles se présentent généralement en groupes de trois, mais il arrive que se forment à la base des branches fertiles des grappes de huit et mêmes douze fleurs.
- **Caractéristiques agronomiques** : Sa floraison commence quelques jours avant et se termine un peu après celle de la variété Hayward. Comme elle présente une floraison échelonnée, elle permet la pollinisation de toutes les variétés.

Annexe 3 : METHODOLOGIES UTILISEES POUR L'OBTENTION DE L'EMBRYOGENESE SOMATIQUE DIRECTE CHEZ DIFFERENTES ESPECES

ETUDE DES FACTEURS DE REGENERATION, DES TECHNIQUES DE MULTIPLICATION ET DE PRODUCTION

Type d'explant	Milieu de base	Traitement d'induction	Traitement de développement	Référence
Cotylédons d' <i>Arachis hypogaeae</i> L. (Leguminosae)	MS	BAP +2.68 µM NAA	Idem ou sans régulateurs de croissance	Venkatachalam et al., (1999)
Axes d'embryons matures de <i>Cicer arietinum</i> L.	MS (3% sacch., 0.6% Agar)	1 ; 3 ; 5 ; 10 mg/l 2, 4,5-T	mg/l ABA (maturation) 1mg/l zeatin (conversion)	Suhasini et al., (1994)
Sections d'hypocotyles de <i>Daucus carota</i> L.cv. Koshigosun (Umbelliferae)	MS liquide (3% sacch.), agité	1 mg/l 2.4-D	MS liquide sans 2.4-D	Masuda et al., (1995)
Plantules de <i>Daucus carota</i> L. cv. Tokinashigosun (Umbellifereae)	- - -	- 0.01 ; 0.1 ; 1 mg/l 2.4-D (24h) - 1 mg/l IAA (24h) - 0.1 ; 1 mg/l NAA (24h)	-MS, 3% sacch., 0.3% gerlite	Sueishi & Tanimoto, (1994)
Graines de <i>Daucus carota</i> L. cv. Tokinashigosun	- MS (3% sacch., 0.3% gerlite)	-10 ⁻⁸ à 10 ⁻⁵ M 2.4-D 1 jour	-MS, 3% sacch., 0.3% gerlite	
Segments de pétioles de plantules de 2 mois de <i>Echinacea purpurea</i> L. cultivées sur BAP ou TDZ avec IAA	MS + vitamines de Gamborg + 3% sacch. + 0.3% gerlite	BAP	MS sans BAP	Choffe et al., (2000)
Embryons immatures : Glycine max L. (Leguminoseae)	- MS (3% sacch.) - B ₅ (2% sacch.) - B ₅ /2 (1.5% sacch.) - MS/2 (1.5% sacch.) - B ₅ (2% sacch.)	- 5 mg/l 2.4-D - 0.1 mg/l IBA - - - 0.1mg/l IBA + 10% lait coco	Idem (traitement de déshydratation puis germination sur 4 ^{ième} milieu de base)	Hammatt & Davey, (1987)
Extrémités apicale : Ipomoea batatas (L.) Lamb. (Convolvulaceae)	MS (3% sacch.)	3 mg/l acid picolinic + 1 mg/l kin 2mg /l acid picolinic + 1mg/l kin	Idem ou sans régulateurs de croissance	Desamero et al., (1994)
Segments de feuilles : <i>Medicago falcata</i> L. (Leguminoseae)	B ₅ (Gamborg et al., 1968)	4 mg/l 2.4-D + 0.2 mg/l kin + 1 mg/l adénine + 10 mg/l glutathion	2.5% PEG 6000 Maturation : B ₅ + 30 µM ABA Conversion : MS + 27 µM GA ₃	Kuklin et al., (1994)
Cotylédons d'embryons immatures de <i>Panax ginseng</i> (Araliaceae)	MS (prétraitement facultatif avec saccharose 1M pendant 24- 72 heures)	-	GA ₃ ou traitement au froid pour permettre germination	Choi et al., (1999)
Limbe de feuilles de plantules de <i>Phoenix dactylifera</i> L.	MS	NAA + 2iP + K	MS (formation de racines sur MS + 0.1 mg/l NAA)	Sudhersan et al., (1999)
Cultivar barhee, issues d'embryogenèse somatique indirecte in vitro (Palmae)				
Méristème apical de tige de <i>Pisum sativum</i> , <i>P. arvense</i> , <i>P. elatius</i> et <i>P.</i>	MSB (3% sacch. + 0.7% Difco agar)	2.5 µM picloram	Idem ou sans picloram. Germination sur milieu sans régulateurs de	Griga, (1998)

Abréviations : MS/2 (milieu de base de Murashige et Skoog, 1962, macro- et microéléments dilués 2 x) ; MSB (milieu de base de Murashige et Skoog, 1962, modifié) ; 2,4,5-T (acide 2,4,5- trichlorophénoxyacétique) ; sacch. (Saccharose) ; B₅ (milieu de base de Gamborg et al., 1968) ; B₅/2 (milieu de base de Gamborg et al., 1968, macro- et microéléments dilués 2 x) ; PEG (polyéthylène glycol) ; 2iP (N⁶ (2-isopentyl) adénine) ; L₂ (milieu de base de Rupert et Collins, 1984) ; C (charbon actif) ; IBA (acide indol-3-butyrique)

Annexe 4 : METHODOLOGIES UTILISEES POUR L'OBTENTION DE L'EMBRYOGENESE SOMATIQUE INDIRECTE CHEZ DIFFERENTES ESPECES

ETUDE DES FACTEURS DE REGENERATION, DES TECHNIQUES DE MULTIPLICATION ET DE PRODUCTION

Type d'explant	Milieu de base	Traitement d'induction	Traitement de développement	Référence
Embryons immatures d' <i>Acacia farnesiana</i> et <i>A. schaffneri</i> (Leguminoseae)	MS liquide ou semi- solide, 3% sacch.	9.05 µM 2.4-D + 4.65 µM kin	-MS semi- solide seul ou avec + 3.78 µM ABA -Pour germination : MS/2 semi- solide seul ou avec 217 µM sulfate d'adénine ou µM BA ou 5.77 µM GA ₃	Ortiz et al., (2000)
Segments de tiges et cladodes d' <i>Asparagus officinalis</i> L. (Asparagaceae)	MS avec 3% sacch. et 0.3% phytigel	1.07 µM NAA + 0.09	- Plusieurs sub-cultures avec 4.53 µM 2.4-D - 4% sacch + 800 mg/l glutamine + 500 mg/l d'hydrolysate de caséine acide + 2.93 µM ancymidol + 0.54 µM NAA + 2.32 µM kin - Idem + ABA (0.09 à 0.38 µM) + ancymidol (0.98 à 3.93 µM)	Li et Wolyn, (1996)
Pétioles de plantules de <i>Daucus carota</i> L. 'Queen Anne's Lace' (Umbellifereae)	MS 0.4 mg/l thiamine- HCl 100mg/l myo-inositol 3% sacch., 0.7% Difco agar	0.1 mg/l 2.4-D	MS sans 2.4-D	Tisserat et Murashige, (1977)
Segments d'hypocotyles	MS avec organique de	1; 10 mg/l IAA ou NAA ou IBA 0.01 ; 0.1 mg/		Kamada et harada,

de <i>Daucus carota</i> L. cv. US-Harumakigosun (Umbelliferae)	Nitsch et Nitsch (1965), 3% sacch, 0.1% agar	1 2.4-D ou MCPA ou 2.4.5-T 0.01 ; 0.1 ; 1 ; 10 mg/l NOA 0.1; 1 mg/l PCPA	Idem ou MS sans régulateurs de croissance	(1979) Nisch et Nisch , (1965)
Bourgeons floraux (thalamus au-dessus des étamines) de <i>Ranunculus asiaticus</i> L. (Ranunculaceae)	MS avec 3% sacch. + 100 mg/l glutamine + 80 mg/l adénine sulfate + 0.8% Difco bacto agar	0.5 ; 2 mg/l kin + 0.5 ; 1 mg/l BA + 0.92 µM 2.4-D	- 4mg/l de kin + 2 mg/l de BA + 0.46 µM 2.4-D - 8 mg/l kin + (2; 4 mg/l) BA + 0.23 µM 2.4-D - Idem sans 2.4-D	Beruto et al., (1996)
Segments de feuilles issues de pousses apicales et axillaires cultivées in vitro, de <i>Rosa hybrida</i> cv. Carl Red (Rosaceae)	MS (3% sacch. Et 0.2% de gellan gum)	0.25 à 5 mg/l NAA ; 3 mg/l 2.4-D ; 5 mg/l IBA	0.5 à 10 mg/l BAP 0.1 à 10 mg/l TDZ puis 2 mg/l BAP pour élévation puis sans régulateurs de croissance pour enracinement	Visessuwan et al., (1997)
Segments de cotylédons et d'hypocotyles : <i>Sesamum indicum</i> L. cv. Nigrum	B ₅ (Gamborg et al., 1968) Fe de MS, 2% sacch., 0.8% agar	0.5 ; 1 mg/l BAP + 0.5 ; 1 mg/l 2.4-D	-0.5% C, 3% sacch., 3% mannitol -MS + 1mg/l GA ₃ + 10 mg/l AgNO ₃ pour conversion	Xu et al., (1997)
Bourgeons apicaux et bourgeons axillaires : <i>Tectona grandis</i> L.	MS (milieu semi-solide) MS/2 (milieu liquide)	mg/l BAP + 0.01 mg/l NAA 0.5 mg/l BAP + 0.1 mg/l NAA	-	Kushalkar et Sharon, (1996)
Staminodes de bourgeons floraux de <i>Theobroma cacao</i> L.	1-DKW (Driver et Kuniyuki, 1984 ; Tulecke et McGranahan, 1985), 2% glucose 2-McCown (Lloyd et McCown, 1980) et vitamines de Gamborg (1968), 2% glucose	- 250 mg/l glutamine, 200 mg myo- inositol, 2mg/l thiamine- HCl, 1 mg/l acid nicotinic, 2 mg/l glycine, 9 µM 2.4-D et 454.5 µM TDZ -9 µM 2.4-D + 1.4 µM kin + 50 ml/l lait de coco	- DKW + 100 mg/l myo- inositol + 2 mg/l thiamine- HCl + 1 mg/l acid nicotinic + 2 mg/l glycine + 3% sacch. + 0.1% glucose - Conversion avec DKW/5, 100 mg/l myo- inositol, 2 mg/l thiamine- HCl, 1 mg/l acid nicotinic, 2 mg/l glycine, 1% glucose, 0.5% sacch. et 0.2 g/l KNO ₃	Li et al., (1998)

Abréviation : MS/2 (milieu de base de Murashige et Skoog, 1962, macro- microéléments dilués 2 x) ; sacch. (saccharose) ; IBA (acide indole-3- butyrique) ; MCPA (acide 2- méthyl-4- chlorophénoxyacétique) ; NOA (acide 2- naphtoxyacétique) ; C (charbon actif) ; DKW (milieu de base de Driver et Kuniyuki, 1984 et Tulecke et McGranahan, 1985) ; McCown (milieu de base de Lloyd et McCown, 1980) ; DKW/5 (milieu de base de Driver et Kuniyuki, 1984 et Tulecke et McGranahan, 1985, macro- et microéléments dilués 5x).

Annexe 5 : COMPOSITION DU MILIEU DE CULTURE UTILISES

1- M₁ : milieu de base MS (MURASHIGE et SKOOG, 1962)

Ce milieu est composé de macroéléments, des microéléments, des vitamines, acides aminés et du fer de Murashige et Skoog (1962).

Macro de MS (1962)

- NH_4NO_3 1650 mg/l
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 332.2 mg/l
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 370 mg/l
- KNO_3 1900mg/l
- KH_2PO_4 170mg/l.

Micro de MS (1962)

- $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.025 mg/l
- $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.025 mg/l
- H_3BO_3 6.2 mg/l
- KI 0.83 mg/l
- $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 16.9 mg/l
- $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.25 mg/l
- $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 8.6mg/l.

Vitamines et acides aminés de MS (1962)

- Acide nicotinique 0.5 mg/l
- Pyridoxine 0.5 mg/l
- Thiamine 0.1 mg/l
- Glycine 2 mg/l
- Myo- inositol 100 mg/l.

Chélates de Fer de MS (1962)

- $\text{Fe SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 27.8 mg/l
- Na_2EDTA 37.3 mg/l.
- Agar 8 g/l (ou selon spécifié)
- Saccharose 30 g/l
- pH 5.7.

2- M₂ : Milieu de base M₁ (MS) + Vitamines de Morel (1952).

Vitamine de Morel (1952) in Gautheret (1959):

- Myo- inositol 5000mg/ 100ml
- Panthotenate de calcium 50 mg/100ml

- Acide nicotinique 50 mg/100ml
- Pyridoxine 50mg/100ml
- Thianine 50mg/100ml
- Biotine 0.5mg/100ml.

2-1-Milieu induisant la callogenèse

- M₂C₀ (Témoin sans hormones)
- M₂C₁: M₂+ (1 mg/l 2.4-D)
- M₂C₂: M₂+ (1 mg/l 2.4-D + 1 mg/l kin)
- M₂C₃: M₂+ (1 mg/l 2.4-D + 1mg/l BAP)
- M₂C₄: M₂+ (1 mg/l AIA + 1mg/l kin)
- M₂C₅: M₂+ (1 mg/l AIA + 1 mg/l BAP)
- M₂C₆: M₂+ (1 mg/l AIA + 1mg/l 2.4-D).

2-2-Milieu induisant la caulogénèse

- M₂B₀ (Témoin sans hormones)
- M₂B₁: M₂+ (0.5 mg/l AIA + 1 mg/l BAP)
- M₂B₂: M₂+ (0.5 mg/l AIA + 2 mg/l BAP)
- M₂B₃: M₂+ (0.5 mg/l AIA + 1 mg/l kin)
- M₂B₄: M₂+ (0.5 mg/l AIA + 2 mg/l kin).

2-3-Milieu induisant l'allongement des pousses feuillées

- M₂A₀ (Témoin sans hormones).
- M₂A₁: M₂+ (1 mg/l AG₃)
- M₂A₂: M₂+ (1 mg/l AG₃ + 1mg/l BAP).

3- M₃ (MS/2) ou (M₁/2)

Milieu induisant l'enracinement

Ce milieu est composé de macroéléments dilués de moitié du fer et des microéléments de MURASHIGE et SKOOG (1962). M₃R₀ (Témoin MS/2 sans hormones).

- M₃R₁: M₃+ (0.5 mg/l AIA)
- M₃R₂: M₃+ (0.5 mg/l AIA + 0.25 mg/l BAP)
- M₃R₃: M₃+ (0.5 mg/l AIA + 0.25 mg/l (kin)).

5-Milieu induisant le bourgeonnement axillaire

4- M₄ : milieu de base GMS (Gamborg et Murashige et Skoog, 1962)

Ce milieu est composé des macroéléments de Gamborg et al. (1968) et de microéléments, des vitamines, acides aminés et du fer de Murashige et Skoog (1962).

Macro de Gamborg (1968)

- KNO₃2500 mg/l

- $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 170 mg/l
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 150 mg/l
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 250mg/l
- $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ 134mg

4-1- milieu induisant le bourgeonnement axillaire

- **M 4** : (GMS témoin)
- M_4Ba_0 (GMS témoin).
- M_4Ba_1 : M_4+ (0.5 μM kin)
- M_4Ba_2 : M_4+ (5 μM kin)
- M_4Ba_3 : M_4+ (2.5 μM AIA)
- M_4Ba_4 : M_4+ (5 μM AIA)
- M_4Ba_5 : M_4+ (5 μM BAP)
- M_4Ba_6 : M_4+ (5.37 μM NAA)
- M_4Ba_7 : M_4+ ((macro de Gamborg dilué 2 x) + 5.37 μM NAA + 2 g/l C (charbon actif))
- M_4Ba_8 : M_4+ (0.5 μM BAP)
- M_4Ba_9 : M_4+ (2.5 μM BAP).

5-Milieu induisant l'embryogenèse somatique directe

- **M 5** (M_1 + 25 μM 2.4-D)
- **M 6** (M_1 + 750 mg/l glutamine)
- **M 7** (M_1 + (5.37 μM NAA + 2.5 μM AG_3)).

6-Milieu induisant l'embryogenèse somatique indirecte

- **M 8** (M_1 + 4.5 μM (2.4-D) + 4.6 μM (kin) + 8g/l d'Agar)
- **M 9** (M_1 + 4.5 μM (2.4-D) + 4.6 μM (kin) + 12g/l d'Agar)
- **M 10** (M_1 + 4.65 μM (kin) + 8g/l d'Agar)
- **M 11** (M_1 + 4.65 μM (kin) + 12g/l d'Agar)
- **M 12** (M_1 + 4.65 μM (kin) + 10 μM (ABA) + 8g/l d'Agar)
- **M 13** (M_1 + 4.65 μM (kin) + 10 μM (ABA) + 12g/l d'Agar).

7- M 14 milieu de Barlass

Ce milieu est composé de macroéléments de Barlass, (1974) et de microéléments, de vitamines, acides amines et du fer de Murashige et Skoog (1962).

Macro de Barlass (1974)

- KNO_3 1900 mg/l
- $\text{NH}_4 \text{NO}_3$ 1650 mg/l
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 440 mg/l

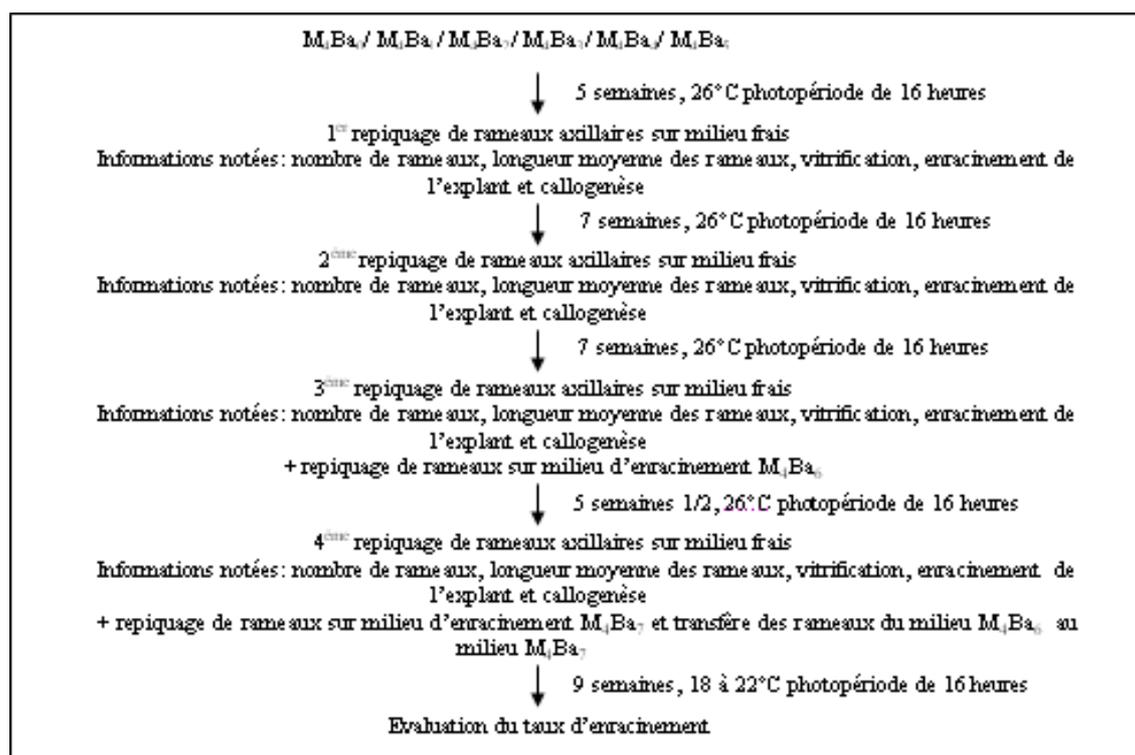
- KH_2PO_4 370 mg/l.
- Agar 0 g
- Saccharose 30 g/l
- pH 5.7.

8- Milieu de Haupt

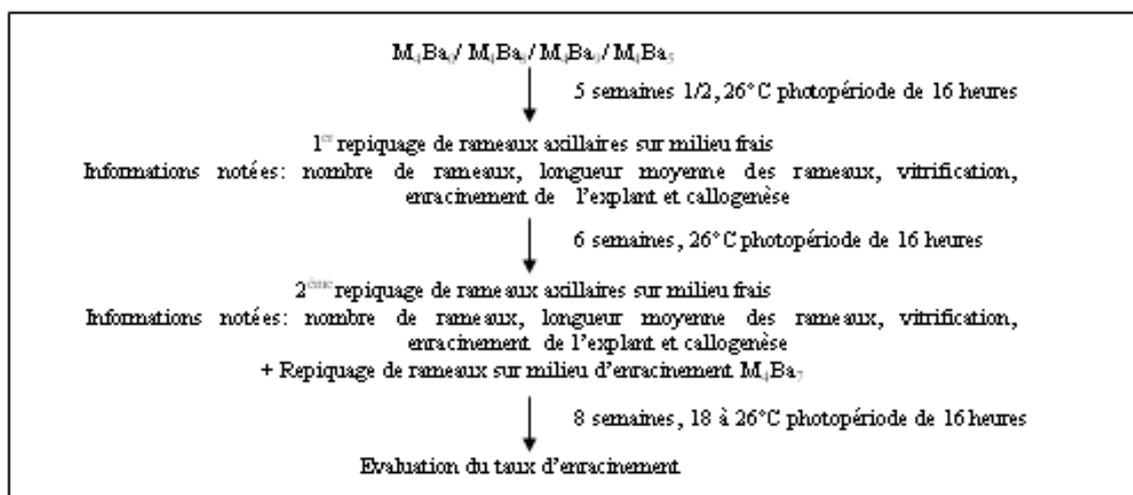
Dans 100 ml d'eau distillée, nous ajoutons :

- 10 g de gélatine
- 15 ml de glycérine
- 2 ml de phénol.

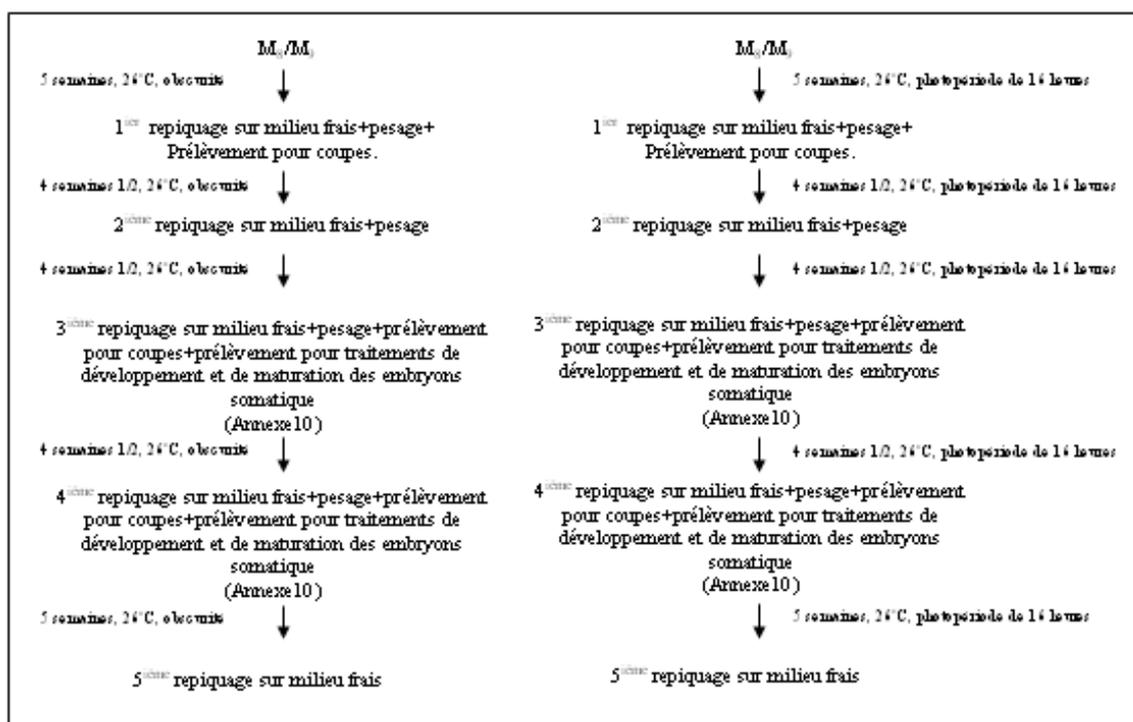
Annexe 6: ESSAIS DE MULTIPLICATION PAR BOURGEONNEMENT AXILLAIRE AVEC EXPLANTS ISSUS DE PLANTULES DE 8 SEMAINES



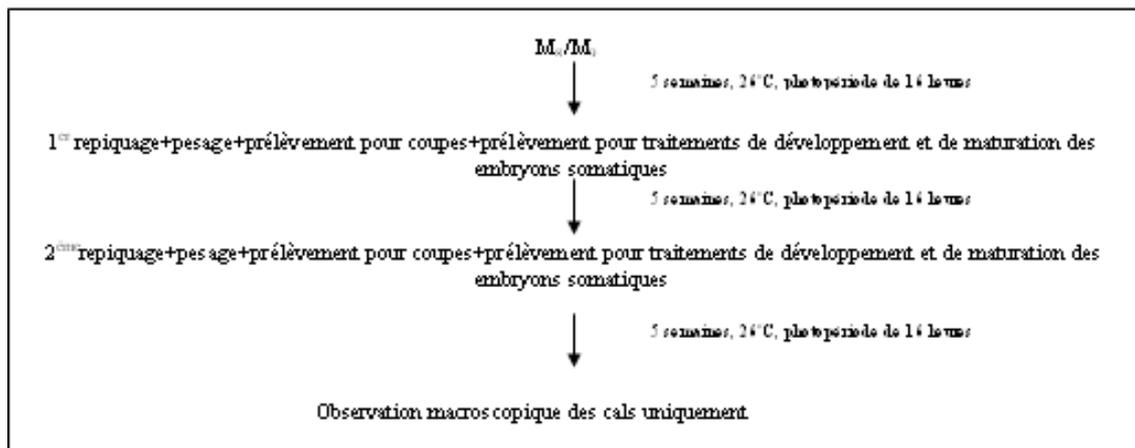
Annexe 7: ESSAIS DE MULTIPLICATION PAR BOURGEONNEMENT AXILLAIRE AVEC EXPLANTS ISSUS DE PLANTULES DE 16 SEMAINES



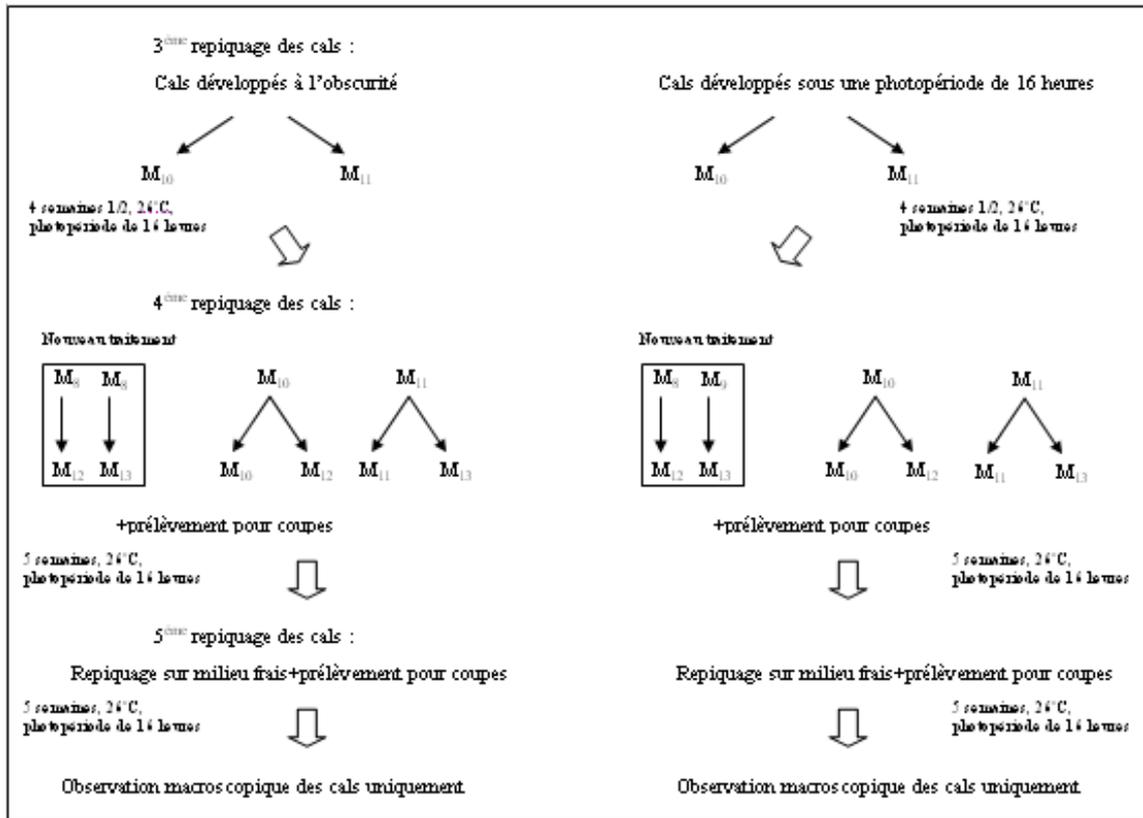
Annexe 8 : TRAITEMENTS D'INDUCTION D'EMBRYOGENESE SOMATIQUE DE PLANTULES AGEES DE 8 SEMAINES (BOUFARIK)



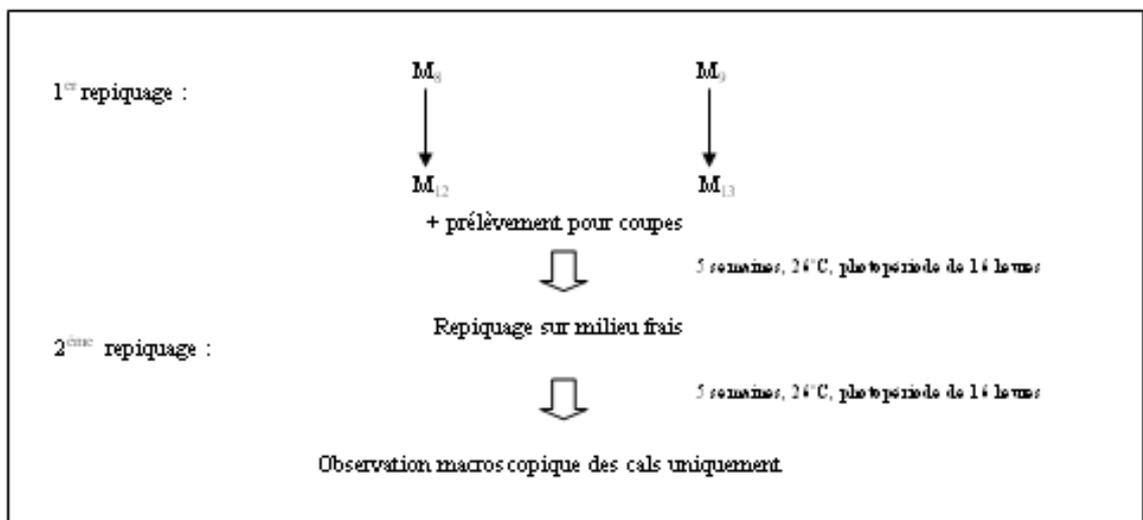
Annexe 9 : TRAITEMENTS D'INDUCTION D'EMBRYOGENESE SOMATIQUE DE PLANTULES AGEES DE 16 SEMAINES (BOUFARIK)



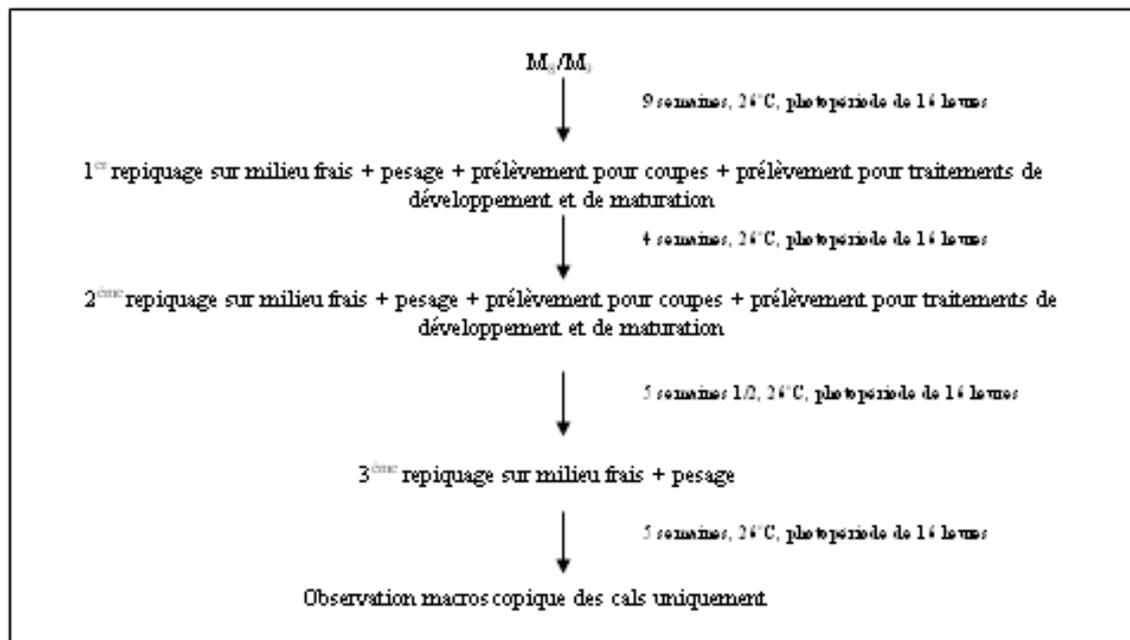
Annexe 10 : DEVELOPPEMENT ET DE MATURATION DES EMBRYONS SOMATIQUES DE PLANTULES AGEES DE 8 SEMAINES (BOUFARIK)



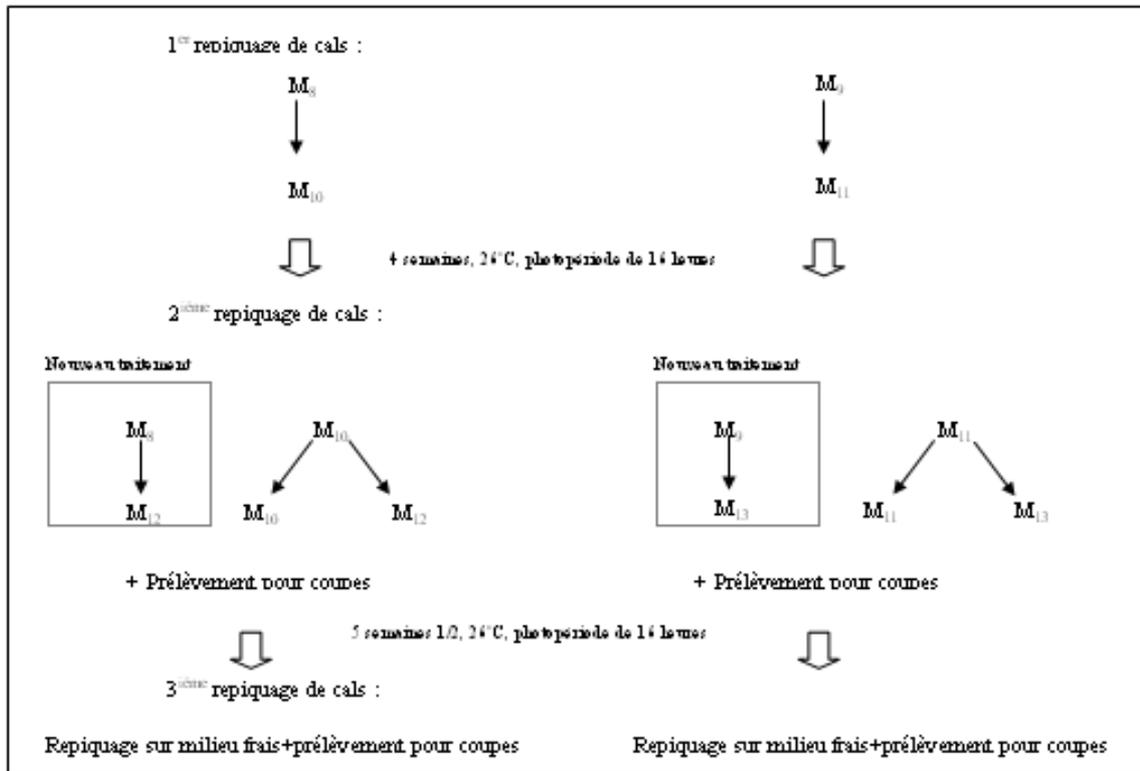
Annexe 11: DEVELOPPEMENT ET DE MATURATION DES EMBRYONS SOMATIQUES DE PLANTULES AGEES DE 16 SEMAINES (BOUFARIK)



Annexe 12 : TRAITEMENTS D'INDUCTION DE CALLOGENESE ET D'EMBRYOGENESE SOMATIQUE DE PLANTULES AGEES DE 8 SEMAINES (TOULOUSE)



Annexe 13 : DEVELOPPEMENT ET MATURATION DES EMBRYONS SOMATIQUES DE PLANTULES AGEES DE 8 SEMAINES (TOULOUSE)



Annexe 14 : ANALYSE DE LA VARIANCE : TAUX DE LA CALLOGENESE (VITRO- SEMIS)

	S.C.E	D.D.L	Carrés moyens	Test F.	Probabilité.	E.T	C.V
Var. totale	9577,95	27	354,74				
Var. F1	967,04	1	967,04	395,76	0,0000		
Var. F2	6575,84	6	1095,97	407,73	0,0000		
Var. inter.F1F2	1997,44	6	332,91	123,91	0,0000		
Var. résiduelle	37,63	14	2,69			1,64	6,3%

Annexe 15 : VARIATION DU TAUX DE LA CALLOGENESE EN FONCTION DES DIFFERENTS MILIEUX ET TYPE D'EXPLANTS (VITRO- SEMIS)

F2	M ₁ C ₀	M ₁ C ₁	M ₁ C ₂	M ₁ C ₃	M ₁ C ₄	M ₁ C ₅	M ₁ C ₆	Moy.F2	Groupes Homog.
F1									
Disques foliaires	1,38 ±0,01	48,89 ±1,05	16,21 ±1,63	70,30 ±3,25	49,65 ±2,77	19,56 ±1,80	18,56 ±0,95	32,08 ±1,52	A
Pétiolés	7,85 ±0,04	32,88 ±0,40	14,39 ±1,97	20,85 ±1,20	36,93 ±0,71	12,19 ±0,44	17,17 ±0,21	20,32 ±0,77	B
Moyenne F1	4,63 ±0,02	40,88 ±0,65	15,30 ±1,47	45,58 ±2,00	43,29 ±1,65	15,87 ±1,07	17,86 ±0,56	Moyenne Générale= 26,20	
Groupes Homogènes	D	B	C	A	B	C	C		

Annexe 16 : ANALYSE DE LA VARIANCE : POIDS FRAIS DES CALS (VITRO- SEMIS)

	S.C.E	D.D.L	Carrés moyens	Test F.	Probabilité.	E.T	C.V
Var. totale	375345.06	27	13901.67				
Var. F1	23914.81	1	23914.81	591.63	0,0000		
Var. F2	236797	6	39466.22	976.36	0,0000		
Var. inter.F1.F2	114067.06	6	19011.18	470.32	0,0000		
Var. résiduelle	565.91	14	40.42			6.36	3.7%

Annexe 17 : VARIATION DU POIDS FRAIS DES CALS (mg), EN FONCTION DES DIFFERENTS MILIEUX ET TYPES D'EXPLANTS (VITRO- SEMIS)

F2	M ₁ C ₀	M ₁ C ₁	M ₁ C ₂	M ₁ C ₃	M ₁ C ₄	M ₁ C ₅	M ₁ C ₆	Moy.F2	Groupes Homogènes.
F1									
Disques foliaires	40.95 ±3.18	278.00 ±2.83	131.00 ±11.31	349.50 ±4.95	417.00 ±5.66	73.00 ±6.36	110.00 ±4.24	199.99 ±4.84	A
Pétiolés	61.30 ±1.13	296.50 ±13.44	211.50 ±6.36	162.50 ±6.36	109.00 ±5.66	70.00 ±1.41	80.00 ±2.83	141.54 ±4.84	B
Moyenne F1	51.13 ±1.95	287.25 ±7.93	171.25 ±7.49	256.00 ±4.65	263.00 ±4.62	71.75 ±3.76	95.00 ±2.94	Moyenne Générale= 170.77	
Groupes Homogènes	F	A	C	B	B	E	D		

Annexe 18 : ANALYSE DE LA VARIANCE : POURCENTAGE DE CALLOGENESE (IN SITU)

	S.C.E	D.D.L	Carrés moyens	Test F.	Probabilité.	E.T	C.V
Var. totale	9175.62	27	339.84				
Var. F1	3868.57	1	3868.57	540.59	0,0000		
Var. F2	4336	6	722.81	101.00	0,0000		
Var. inter.F1 F2	870.02	6	145.00	20.26	0,0000		
Var. résiduelle	100.19	14	7.16			2.68	10.4%

Annexe 19 : VARIATION DU TAUX DE LA CALLOGENESE EN FONCTION DES DIFFERENTS MILIEUX ET TYPES D'EXPLANTS (IN SITU)

F2	M ₁ C ₀	M ₂ C ₁	M ₃ C ₂	M ₄ C ₃	M ₅ C ₄	M ₆ C ₅	M ₇ C ₆	Moy.F2	Groupes Homogènes.
F1									
Entre-nœuds	10.66 ±1.90	57.51 ±2.14	25.93 ±2.02	52.03 ±3.03	61.46 ±3.19	29.31 ±2.55	25.75 ±5.59	37.52 ±2.31	A
Pétioles	4.00 ±1.41	23.60 ±3.68	10.65 ±0.92	21.24 ±1.76	20.48 ±1.39	11.41 ±2.73	6.71 ±1.44	14.01 ±1.54	B
Moyenne F1	7.33 ±1.37	40.56 ±2.45	18.29 ±1.28	36.64 ±2.02	40.98 ±2.01	20.36 ±2.16	16.23 ±3.33	Moyenne Générale= 25.77	
Groupes Homogènes	C	A	B	A	A	B	B		

Annexe 20 : ANALYSE DE LA VARIANCE : POIDS FRAIS DES CALS (mg) (IN SITU)

	S.C.E	D.D.L	Carrés moyens	Test F.	Probabilité.	E.T	C.V
Var. totale	1113798.75	27	41251.81				
Var. F1	426569.12	1	426569.12	3164.79	0,0000		
Var. F2	547732.75	6	91288.79	677.29	0,0000		
Var. inter.F1 F2	137609.88	6	22934.98	170.16	0,0000		
Var. résiduelle	1887.00	14	134.79			11.61	2.6%

Annexe 21 : VARIATION DU POIDS FRAIS DES CALS (mg), EN FONCTION DES DIFFERENTS MILIEUX ET TYPES D'EXPLANTS (IN SITU)

F2	M ₁ C ₀	M ₁ C ₁	M ₁ C ₂	M ₁ C ₃	M ₁ C ₄	M ₁ C ₅	M ₁ C ₆	Moy.F2	Groupes Homogènes.
F1									
Entre-nœuds	211.5 ±6.13	339.5 ±8.03	359.5 ±5.27	748.5 ±5.98	781.5 ±4.35	649.0 ±7.11	688.0 ±8.47	548.21 ±6.96	A
Pétioles	187.0 ±3.15	199.0 ±6.10	295.0 ±3.92	399.0 ±2.32	420.0 ±5.02	312.0 ±4.82	297.0 ±3.80	301.36 ±4.12	B
Moyenne F1	199.25 ±4.24	299.25 ±6.36	327.5 ±3.59	573.7 ±4.10	600.7 ±3.68	480.50 ±4.96	492.50 ±6.52	Moyenne Générale= 424.77	
Groupes Homogènes	F	E	D	B	A	C	C		

Annexe 22 : ANALYSE DE LA VARIANCE : TAUX DE POUSES FEUILLEES DEVELOPPEES (VITRO-SEMIS)

	S.C.E	D.D.L	Carrés moyens	Test F.	Probabilité.	E.T	C.V
Var. totale	7026.05	15	468.40				
Var. F1	3438.94	1	3438.94	778.30	0,0000		
Var. F2	1623.89	3	541.30	122.51	0,0000		
Var. inter.F1.F2	1927.87	3	642.62	145.44	0,0000		
Var. résiduelle	35.35	8	4.42			2.1	4.8%

Annexe 23: VARIATION DU TAUX DE POUSES FEUILLEES EN FONCTION DES DIFFERENTS MILIEUX ET TYPES D'EXPLANTS (VITRO- SEMIS)

F2	M ₁ B ₁	M ₁ B ₂	M ₁ B ₃	M ₁ B ₄	Moyenne.F2	Groupes Homogènes.
F1						
Pétioles	59.35 ±0.92	37.40 ±3.96	9.35 ±0.92	9.57 ±0.60	28.92 ±1.59	B
Disques foliaires	58.40 ±2.40	55.25 ±1.99	61.63 ±2.40	20.85 ±1.20	58.24 ±1.59	A
Moyenne F1	58.87 ±1.49	46.33 ±2.56	35.49 ±1.49	45.58 ±0.90	Moyenne Générale= 43.58	
Groupes Homogènes	A	B	C	C		

Annexe 24 : ANALYSE DE LA VARIANCE : POIDS FRAIS DES CALS (VITRO- SEMIS)

	S.C.E	D.D.L	Carrés moyens	Test F.	Probabilité.	E.T	C.V
Var. totale	254600.00	15	16973.33				
Var. F1	420.25	1	420.25	0.75	0,4151		
Var. F2	103523.50	3	34507.83	61.75	0,0000		
Var. inter.F1.F2	146182.25	3	48727.42	87.13	0,0000		
Var. résiduelle	4474.00	8	559.25			23.65	5.2%

Annexe 25: VARIATION DU POIDS FRAIS DES CALS (mg), EN FONCTION DES DIFFERENTS MILIEUX ET TYPES D'EXPLANTS (VITRO- SEMIS)

F2	M ₁ B ₁	M ₁ B ₂	M ₁ B ₃	M ₁ B ₄	Moy.F2	Groupes Homogènes.
F1						
Pétioles	526.50 ±10.53	468.50 ±9.35	293.00 ±5.86	554.50 ±11.09	460.63 ±9.21	A
Disques foliaires	440.50 ±6.36	673.00 ±5.66	419.00 ±8.38	269.00 ±4.24	450.38 ±9.77	A
Moyenne F1	483.50 ±9.67	570.75 ±7.67	356.00 ±7.12	411.75 ±8.23	Moyenne Générale= 455.50	
Groupes Homogènes	B	A	D	C		

Annexe 26 : ANALYSE DE LA VARIANCE : TAUX DE POUSES FEUILLEES DEVELOPPEES (IN SITU)

	S.C.E	D.D.L	Carrés moyens	Test F.	Probabilité.	E.T	C.V
Var. totale	2709.74	15	180.65				
Var. F1	549.84	1	549.84	116.23	0,0000		
Var. F2	704.15	3	234.72	49.64	0,0000		
Var. inter.F1F2	1418.12	3	472.71	99.96	0,0000		
Var. résiduelle	37.83	8	4.73			2.17	10.1%

Annexe 27: VARIATION DU TAUX DE POUSES FEUILLEES EN FONCTION DES DIFFERENTS MILIEUX ET TYPES D'EXPLANTS (IN SITU)

F2	M ₁ B ₁	M ₁ B ₂	M ₁ B ₃	M ₁ B ₄	Moy.F2	Groupes Homogènes.
F1						
Entre- noeuds	25.00 ±0.99	23.85 ±1.36	35.64 ±2.63	24.80 ±0.28	27.32 ±1.23	A
Pétioles	22.60 ±3.68	37.80 ±3.11	0.95 ±0.01	1.05 ±0.02	15.60 ±1.97	B
Moyenne F1	23.80 ±2.20	30.83 ±2.03	18.30 ±1.71	12.93 ±0.87	Moyenne Générale= 21.46	
Groupes Homogènes	B	A	C	D		

Annexe 28 : ANALYSE DE LA VARIANCE : POIDS FRAIS DES CALS (IN SITU)

	S.C.E	D.D.L	Carrés moyens	Test F.	Probabilité.	E.T	C.V
Var. totale	1189395.00	15	79293.00				
Var. F1	695139.12	1	695139.12	284.74	0,0000		
Var. F2	315696.75	3	105232.25	43.10	0,0001		
Var. inter.F1F2	159028.62	3	53009.54	21.71	0,0005		
Var. résiduelle	19530.50	8	2441.31			49.41	6.8%

Annexe 29: VARIATION DU POIDS FRAIS DES CALS (mg), EN FONCTION DES DIFFERENTS MILIEUX ET TYPES D'EXPLANTS (IN SITU)

F2	M ₁ B ₁	M ₁ B ₂	M ₁ B ₃	M ₁ B ₄	Moy.F2	Groupes Homogènes.
F1						
Entre- noeuds	1283.00 ±25.66	665.50 ±13.31	984.50 ±19.69	809.00 ±16.18	935.50 ±18.75	A
Pétioles	626.50 ±12.53	476.00 ±9.52	416.00 ±8.32	555.50 ±11.11	518.63 ±10.37	B
Moyenne F1	954.75 ±19,09	571.00 ±11.42	682.25 ±13.64	700.25 ±21.70	Moyenne Générale= 727.06	
Groupes Homogènes	A	C	B	B		

Annexe 30 : ANALYSE DE LA VARIANCE : LONGUEUR DE POUSSES FEUILLEES (VITRO- SEMIS)

	S.C.E	D.D.L	Carrés moyens	Test F.	Probabilité.	E.T	C.V
Var. totale	0.28	11	0.03				
Var. F1	0.01	1	0.01	0.26	0.6331		
Var. F2	0.06	2	0.03	1.11	0.3891		
Var. inter.F1F2	0.04	2	0.02	0.60	0.5819		
Var. résiduelle	0.18	6	0.02			0.17	7.0%

Annexe 31: VARIATION DE LA LONGUEUR DE POUSSES FEUILLEES (cm), EN FONCTION DES DIFFERENTS MILIEUX ET TYPES D'EXPLANTS (VITRO- SEMIS)

Milieux	M_1A_0	M_1A_1	M_1A_2	Moyenne (milieu)
Explants				
Pétioles	2.35± 0.07	2.35 ± 0.21	2.40 ± 0.28	2.36
Disques foliaires	2.55 ± 0.07	2.30 ± 0.14	2.50 ± 0.14	2.45
Moyenne (explant)	2.45	2.32	2.45	

Annexe 32 : ANALYSE DE LA VARIANCE : LONGUEUR DE POUSES FEUILLEES (IN SITU)

	S.C.E	D.D.L	Carrés moyens	Test F.	Probabilité.	E.T	C.V
Var. totale	0.57	11	0.051				
Var. F1	0.27	1	0.27	16.2	0,0072		
Var. F2	0.01	2	0.005	0.15	0,8636		
Var. inter.F1F2	0.19	2	0.10	5.85	0,0392		
Var. résiduelle	0.1	6	0.02			0.13	5,3%

Annexe 33: VARIATION DE LA LONGUEUR DE POUSES FEUILLEES (cm), EN FONCTION DES DIFFERENTS MILIEUX ET TYPES D'EXPLANTS

Milieux	M_1A_0	M_1A_1	M_1A_2	Moyenne (milieu)
Explants				
Entre- noeuds	2.70± 0.14	2.65 ± 0.21	2.45 ± 0.07	2.60
Pétioles	2.15 ± 0.07	2.25 ± 0.07	2.50 ± 0.14	2.30
Moyenne (explant)	2.43	2.45	2.47	

Annexe 34: NOMBRE MOYEN DE RAMEAUX PAR EXPLANT OBTENU PAR BOURGEONNEMENT AXILLAIRE

	Milieux de culture					
	M ₁ Ba ₀ (GMS: témoin)	M ₁ Ba ₁	M ₁ Ba ₂	M ₁ Ba ₃	M ₁ Ba ₄	M ₁ Ba ₅
Culture initiale d'extrémité apicale	1 ± 0.07	0 ± 00	2.28 ± 0.64	4.37 ± 2.21	3 ± 1.9	2.16 ± 1.20
Première Sub- culture	2.57 ± 1.78	2.14 ± 1.07	0.78 ± 0.35	3.14 ± 1.86	2.5 ± 1.52	5.08 ± 3.57
Deuxième Sub- culture	1.78 ± 1	2.5 ± 1.78	0.71 ± 0.3	0.28 ± 0.01	2.3 ± 1.86	5.8 ± 3.73
Troisième Sub- culture	1 ± 0.45	2.6 ± 1.78	4.21 ± 2.64	2.84 ± 1.43	5.43 ± 2.36	3.85 ± 0.71

Annexe 35: LONGUEUR MOYENNE DES RAMEAUX (cm) PAR EXPLANT OBTENU PAR BOURGEONNEMENT AXILLAIRE

	Milieux de culture					
	M ₁ Ba ₀ (GMS: témoin)	M ₁ Ba ₁	M ₁ Ba ₂	M ₁ Ba ₃	M ₁ Ba ₄	M ₁ Ba ₅
Culture initiale d'extrémité apicale	0 ± 00	0 ± 00	0.84 ± 0.14	0.78 ± 0.12	0.5 ± 0.2	0.66 ± 0.06
Première Sub- culture	1.7 ± 0.88	1 ± 0.24	0.9 ± 0.34	0.6 ± 0.45	0.58 ± 0.08	0.82 ± 0.08
Deuxième Sub- culture	0.78 ± 0.46	0.58 ± 0.14	0.58 ± 0.18	0.44 ± 0.08	0.46 ± 0.06	0.4 ± 0.06
Troisième Sub- culture	0.43 ± 0.08	0.56 ± 0.14	0.92 ± 0.06	0.42 ± 0.12	0.53 ± 0.06	0.58 ± 0.1

Annexe 36 : TAUX DE VITRIFICATION DES RAMEAUX OBTENUS PAR BOURGEONNEMENT AXILLAIRE

	Milieux de culture					
	M ₁ Ba ₀ (GMS: témoin)	M ₁ Ba ₁	M ₁ Ba ₂	M ₁ Ba ₃	M ₁ Ba ₄	M ₁ Ba ₅
Culture initiale d'extrémité apicale	0 ± 00	0 ± 00	35.00 ± 0.64	42.00 ± 2.21	0.00 ± 00	15.00 ± 1.20
Première Sub- culture	0 ± 00	18.00 ± 1.07	32.00 ± 0.35	49.00 ± 1.86	54.00 ± 1.52	17.00 ± 3.57
Deuxième Sub- culture	17.00 ± 1	13.00 ± 1.78	17.00 ± 0.3	47.00 ± 0.01	39.00 ± 1.86	39.00 ± 3.73
Troisième Sub- culture	0 ± 00	42.00 ± 1.78	47.00 ± 2.64	49.00 ± 1.43	44.00 ± 2.36	41.00 ± 0.71

Annexe 37: TAUX DE CALLOGENESE DES EXPLANTS A PARTIR DE CULTURE INITIALE D'EXTREMITE APICALE EN FONCTION DU MILIEU

	Milieux de culture					
	M ₁ Ba ₀ (GMS: témoin)	M ₁ Ba ₁	M ₁ Ba ₂	M ₁ Ba ₃	M ₁ Ba ₄	M ₁ Ba ₅
Culture initiale d'extrémité apicale	0 ±00	0 ±00	0 ±00	62 ±1.24	50 ±1.00	33 ±0.66
Première Sub- culture	31 ±0.62	55 ±1.10	62 ±1.24	39 ±0.78	56 ±1.12	56 ±1.12
Deuxième Sub- culture	24 ±0.48	27 ±0.54	54 ±1.08	10 ±0.20	77 ±1.54	60 ±1.20
Troisième Sub- culture	24 ±0.48	35 ±0.70	75 ±1.50	22 ±0.44	95 ±1.90	53 ±1.06

Annexe 38: TAUX DE D'ENRACINEMENT DES EXPLANTS A PARTIR DE LA CULTURE INITIALE D'EXTREMITE APICALE EN FONCTION DU MILIEU

	Milieux de culture					
	M ₁ Ba ₀ (GMS: témoin)	M ₁ Ba ₁	M ₁ Ba ₂	M ₁ Ba ₃	M ₁ Ba ₄	M ₁ Ba ₅
Culture initiale d'extrémité apicale	50 ±1.02	19 ±0.38	0 ±00	0 ±00	0 ±00	0 ±00
Première Sub- culture	37 ±	15 ±0.30	0 ±00	0 ±00	0 ±00	0 ±00
Deuxième Sub- culture	24 ±0.40	9 ±0.18	0 ±00	0 ±00	0 ±00	5 ±0.10
Troisième Sub- culture	18 ±0.36	8 ±0.16	0 ±00	0 ±00	0 ±00	0 ±00

Annexe 39: TAUX DE CROISSANCE RELATIF (RGR) MOYEN DES CALS ISSUS DE JEUNES FEUILLES DE PLANTULES AGEES DE 8 SEMAINES SUR MILIEU D'INDUCTION

	Milieux de culture		
	M ₁	M ₂ (PP. 16 heures)	M ₃ (obscurité)
Première Sub- culture	0.08 ± 0.01	0.106 ± 0.012	0.11 ± 0.001
Deuxième Sub- culture	0.035 ± 0.005	0.048 ± 0.01	0.047 ± 0.008
Troisième Sub- culture	0.025 ± 0.004	0.03 ± 0.007	0.044 ± 0.0028

Annexe 40: TAUX DE CROISSANCE RELATIF (RGR) MOYEN DES CALS ISSUS DE JEUNES FEUILLES DE PLANTULES AGEES DE 16 SEMAINES SUR MILIEU D'INDUCTION

	Milieux de culture	
	M ₁	M ₂
Taux de RGR.moyen	0.058 ± 0.007	0.047 ± 0.001

Annexe 41: TAUX DE CROISSANCE RELATIF (RGR) MOYEN DES CALS ISSUS DE JEUNES FEUILLES (TOULOUSE)

	Milieux de culture	
	M ₁	M ₂
Première Sub- culture	0.06 ± 0.005	0.054 ± 0.001
Deuxième Sub- culture	0.045 ± 0.008	0.06 ± 0.002

Annexe 42 : TAUX DE REPRISE DE MERISTEMES DES QUATRE VARIETES ETUDIEES

Matériel végétal	Boutures herbacées des variétés étudiées		
	Nombre de méristèmes extraits	Nombre de méristèmes Contaminés	Taux de reprise des méristèmes
Hayward (V ₁)	50	26	48%
Monty (V ₂)	50	32	36%
Tomuri (V ₃)	50	28	44%
Matua (V ₄)	50	30	40%

Annexe 43 : DIAMETRE DES ROSETTES DES JEUNES FEUILLES (mm)

Matériel végétal traité	Moyen (mm) ± écart type	Groupes Homogènes
Hayward (V ₁)	4.29 ± 0.73	A
Monty (V ₂)	1.96 ± 0.25	A
Tomuri (V ₃)	0.43 ± 0.07	B
Matua (V ₄)	0.43 ± 0.07	B